Učinci timoglobulina na hipoksično-reoksigenacijska oštećenja stanica HEK-293 u kulturi

Jurenec, Franjo

Doctoral thesis / Disertacija

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:386532

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

Franjo Jurenec

UČINCI TIMOGLOBULINA NA HIPOKSIČNO-REOKSIGENACIJSKA OŠTEĆENJA STANICA HEK-293 U KULTURI

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2016.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE
DIVISION OF BIOLOGY

Franjo Jurenec

EFFECTS OF THYMOGLOBULINE ON THE HYPOXIA-REOXIGENATION INJURY IN HEK-293 CELLS IN CULTURE

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2016.

Ovaj je doktorski rad izrađen u Zavodu za fiziologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom izv.prof.dr.sc. Aleksandre Sinđić i izv.prof.dr.sc. Mladena Knoteka, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Zahvaljujem mentoru izv. prof. dr. sc. Mladenu Knoteku za podršku i savjete kod izrade ovog rada.

Posebnu zahvalnost dugujem mentorici izv. prof. dr. sc. Aleksandri Sinđić, koja je uložila puno truda i vremena te je svojim savjetima pomogla da ovaj rad bude oblikovan na ovakav način.

Zahvaljujem prof. Barici Pahić za lektoriranje doktorskog rada.

Mojoj dragoj supruzi i sinovima zahvaljujem na ljubavi, bezuvjetnoj podršci i neizmjernoj vjeri u moj uspjeh.

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Doktorski rad

„Učinci timoglobulina na hipoksično-reoksigenacijska oštećenja stanica HEK-293 u kulturi”

Franjo Jurenec

Zavod za fiziologiju, Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

Antitimocitni globulini su poliklona protutijela koja dovode do smanjenja broja T stanica. Često se koriste za imunosupresiju primatelja tijekom transplantacije bubrega. Timoglobulin su IgG protutijela dobivena imunizacijom zečeva timocitima ljudskog fetusa. Timoglobulin dovodi do smanjenja broja T-limfocita putem razgradnje stanica mehanizmom ovisnim o komplementu te apoptozom. Da bismo dokazali direktan učinak timoglobulina na stanice, koristili smo ljudske embrionalne stanice porijeklom iz bubrega (HEK-293) u staničnoj kulturi. Mjerili smo membranski potencijal stanice metodom prikovanih potencijala. Depolarizacijski učinak timoglobulina na membranski potencijal HEK-293 stanica je ovisan o koncentraciji timoglobulina te o početnom membranskom potencijalu stanica. Učinak timoglobulina u hipoksično-reoksigenacijskih uvjetima utvrđen je određivanjem stanične smrtnosti te stanične migracije testom grebanja. Timoglobulin je smanjio staničnu smrtnost u hipoksijskim uvjetima nakon kojih je slijedila reoksigenacija. Ovo je prvo istraživanje koje pokazuje direktan učinak timoglobulina na HEK-293 stanice. Rezultati ovog istraživanja potiču nova istraživanja o djelovanju timoglobulina na stanice transplantiranih bubrega.

(101 stranica, 23 slika, 97 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: timoglobulin, patch-clamp, test grebanja, bubrezi, imunocitokemija

Mentori: izv. prof. dr. sc. Mladen Knotek, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
izv. prof. dr. sc. Aleksandra Sinđić, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Ocjenitelji:

1. izv. prof. dr. sc. Danica Galešić Ljubanović, dr. med., Zavod za patologiju, Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

2. prof. dr. sc. Gordana Lacković-Venturin, Zoologijski zavod, Biološki odsjek PMF

3. doc. dr. sc. Inga Marijanović, Zavod za molekularnu biologiju, Biološki odsjek PMF

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Doctoral Thesis

"Effects of Thymoglobuline on the hypoxia-reoxigenation injury in HEK-293 cells in culture"

Franjo Jurenec

Department of Physiology, School of Medicine, University of Zagreb

Antithymocyte globulines are polyclonal T cell-depleting immunoglobulins used in induction of immunosuppression in kidney transplant recipients. Thymoglobuline, is purified rabbit IgG, obtained by immunization of rabbits with fetal human thymi, which depletes T lymphocytes by complement-dependent lysis and apoptosis. To determine possible direct effects of Thymoglobuline on the cells, we used Human Embryonic Kidney cell line (HEK-293) in culture. We measured membrane potential of the cells using slow whole patch clamp technique. Depolarizations of HEK-293 cells caused by Thymoglobuline were concentration- and membrane potential- dependent, showing direct effect of Thymoglobuline on the HEK-293 cells. The effects of Thymoglobuline in hypoxia/reoxigenation were detected by calculating cell death and determining the cell migration using scratch test. Thymoglobuline prevented the cell death induced by hypoxia and reoxigenation conditions. This is first study showing direct effect of thymoglobulin on HEK-293 cells. The results of this study encourage the research on epithelial cells in transplanted kidneys.

(101 pages, 23 figures, 97 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: thymoglobulin, patch-clamp, scratch test, kidney, immunocytochemistry

Supervisor: Associate Prof. Mladen Knotek, School of Medicine, University of Zagreb
Associate Prof. Aleksandra Sinđić, School of Medicine, University of Zagreb

Reviewers:

1. Danica Galešić Ljubanović, MD, PhD, Associate Professor, Department of Pathology, School of Medicine, University of Zagreb

2. Gordana Lacković-Venturin, PhD, Professor, Department of Zoology, Department of Biology, Faculty of Science, University of Zagreb

3. Inga Marijanović, PhD, Assistant Professor, Department of molecular biology, Department of Biology, Faculty of Science, University of Zagreb

POPIS KRATICA:

ANOVA – analiza varijance

AP-1: aktivacijska bjelančevina 1 (engl. *activator protein-1*)

ARDS - akutni respiratorni distres sindroma (engl. *acute respiratory distress syndrome*)

ATG-F - anti-timocitni globulin F

CDK - ciklin-ovisna kinaza (engl. *cyclin-dependent kinases*)

DAG - diacilglicerol

DMEM - Eagle medij prilagođen po Dulbeccou

DMSO - dimetil sulfoksid

EDTA – etilen diamin tetraoctena kiselina

EGTA – etilen glikol tetraoctena kiselina

ENA-78 - peptid koji aktivira neutrofile (engl. *epithelial neutrophil activating peptide*)

FKBP – vezna bjelančevina za takrolimus FK506 (engl. *FK binding protein*)

HEK-293 - ljudske embrionalne bubrežne stanice (engl: *human embryonic kidney cells*)

HLA – antigen ljudskih leukocita (engl. *human leukocyte antigen*)

GREs - elementi glukokortikoidnog odgovora (engl. *glucocorticoid response elements*)

ICAM1 - unutarstanična adhezijska molekula 1 (engl: *intercellular adhesion molecule 1*,)

IKK - inhibitor κB kinaza

IL-interleukin

IMPDH - inozin monofosfat dehidrogenaze

INF-γ - interferon-γ

IP3 - inozitol 1,4,5-trifosfat

Jak - Janus kinaza

JAM-A, junctional adhesion molecule – A

mAb - monoklonsko protutijelo (engl. *monoclonal antibody*)

MAP kinaze - mitogenom aktivirane protein kinaze

MFK - mikofenolna kiselina

MHC - glavni sustava tkivne podudarnosti (engl. *main histocompatibility complex*)

MMF - mikofenolat mofetil

MODS – sindrom zatajenja mnogih organa (engl. *multiple organ dysfunction syndrome*)

NAC - N-acetilcistein

NAD – nikotinamid adenin nukleotid

NADP - nikotinamid adenin nukleotid fosfat

NFAT: jezgrin čimbenik aktiviranih limfocita T (engl. *nuclear factor of activated T cells*)

NF-κB - nuklearni faktor κB

NO - dušikov oksid

NOS - NO sintetaza

O_2^- - superoksidni anion

OH^- - hidroksilni slobodni radikal

PECAM - adhezijska molekula 1 trombocita i endotelnih stanica (engl: *platelet endothelial cell adhesion molecule 1*)

PI-3K - fosfatidil-inozitol-3 kinaza

PIP2 - fosfatidil-inozitol 4,5 bifosfat

ROS - reaktivnim kisikovim oblicima (engl. *reactive oxygen species*)

SIRS – sindrom sustavnog upalnog odgovora (engl. *systemic inflammatory response syndrome*)

SOD - enzim superoksid dismutaza

TGF-ß - čimbenik rasta tumora ß (engl. *tumor growth factor - ß*)

TH1 - T - pomoćnički limfociti

TNF-α – čimbenik nekroze tumora α (engl. *tumor necrosis factor* - α)

TSR - T stanični receptor

VCAM - 1 - adhezijska molekula stanica žila 1 (engl: *vascular cell adhesion molecule 1*)

V_m - membranski potencijal

XD - ksantin dehidrogenaza

XO – ksantinoksidaza

ZAP70 - ζ-vezana bjelančevina (engl. *zeta associated protein*)

SADRŽAJ:

1. UVOD, HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA..……...…….. 1

1.1. Uvod…….…….. 2

1.2. Hipoteza…….……. 4

1.3. Ciljevi istraživanja……..……... 4

2. LITERATURNI PREGLED……..……..……..…….. 5

2.1. Stanica i čimbenici koji oštećuju stanicu..... 6

2.1.1. Hipoksija..... 10

2.1.2. Kemijske tvari i lijekovi..... 10

2.1.3. Fizikalni uzroci..... 10

2.1.4. Mikrobiološki uzroci oštećenja stanice..... 13

2.1.5. Imunološke reakcije..... 15

2.1.6. Genetski poremećaji..... 17

2.1.7. Poremećaji prehrane..... 17

2.1.8. Starenje..... 17

2.2. Mehanizmi staničnog oštećenja..... 19

2.3. Hipoksično-reoksigenacijsko oštećenje..... 21

2.3.1. Stanični učinci hipoksije..... 22

2.3.2. Transkripcijski čimbenik NF-κB..... 25

2.3.3. Antioksidansi..... 27

2.3.4. Uloga citokina u hipoksično-reoksigenacijskom oštećenju..... 29

2.3.5. Uloga komplementa u hipoksično-reoksigenacijskom oštećenju..... 31

2.3.6. Uloga vazoaktivnih tvari u hipoksično-reoksigenacijskom oštećenju. 32

2.4. Presađivanje (transplantacija) organa..... 33

2.4.1. Primjena imunosupresivne terapije..... 36

2.4.2. Anti-timocitni globulini..... 37

2.5. Stanice HEK-293..... 40

3. MATERIJAL I METODE..... 41

3.1. Kultura stanica HEK-293..... 42

3.2. Imunocitokemija..... 43

3.3. Metoda prikovanih potencijala..... 44

3.4. Hipoksično-reoksigenacijsko oštećenje HEK-293 stanica..... 48

3.4.1. Određivanje smrtnosti HEK-293 stanica..... 48
3.4.2. Test grebanja..... 49
3.5. Statistička obrada rezultata..... 50
4. REZULTATI..... 51
4.1. Učinak timoglobulina na promjenu membranskog potencijala HEK-293 stanica..... 52
4.2. Vezanje timoglobulina na HEK-293 stanice..... 56
4.3. Učinak timoglobulina na smrtnost HEK-293 stanica u normoksičnim uvjetima i nakon hipoksično-reoksigenacijskog oštećenja..... 57
4.4. Učinak timoglobulina u normoksičnim uvjetima te nakon hipoksično-reoksigenacijskog oštećenja na migraciju HEK-293 stanica…..... 62
5. RASPRAVA..... 66
5.1. Učinak otapala (glicerola) na membranski potencijal te smrtnost i migraciju HEK-293 stanica tijekom hipoksično-reoksigenacijskog oštećenja..... 67
5.2. Učinak timoglobulina na promjenu membranskog potencijala HEK-293 stanica..... 68
5.3. Učinak timoglobulina na hipoksično-reoksigenacijska oštećenja HEK-293 stanica…..... 69
6. ZAKLJUČAK..... 71
7. POPIS LITERATURE..... 73
8. POPIS SLIKA..... 84
9. ŽIVOTOPIS..... 87

1. UVOD, HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1.1. Uvod

Začepljenje krvne žile, nedostatni ili potpuno prekinuti protok krvi kroz neki organ te naknadna uspostava protoka krvi kroz zahvaćen organ (npr. kod infarkta miokarda i moždanog udara, hipovolemijskog šoka, tijekom transplantacije organa) dovode do stvaranja hipoksijsko-reoksigenacijskog oštećenja. Tijekom ovog oštećenja tkiva dolazi do oksidativnog stresa i aktivacije imunološkog odgovora. Razvoj akutnog odbacivanja presađenog organa, danas najčešće bubrega, djelomično se može objasniti hipoksijsko-reoksigenacijskim oštećenjem (Schneeberger i sur., 1997.). To oštećenje uključuje razaranje epitelnih stanica bubrežnih tubula i aktivaciju endotelnih stanica i leukocita (Thiel i sur., 1998).

U prevenciji nastanka akutnog odbacivanja presađenog organa danas se koriste anti-timocitni globulini koji su smjesa poliklonskih IgG protutijela. Dva preparata su trenutno u kliničkoj primjeni: timoglobulin dobiven imunizacijom životinja ljudskim fetalnim timocitima i anti-timocitni globulin F (ATG-F) dobiven imunizacijom životinja Jurkat stanicama (imortalizirana stanična linija ljudskih T-limfocita). Do danas je dobro proučen učinak ovih preparata na smanjivanje imunološkog odgovora nakon transplantacije organa (smanjenje broja T-limfocita ovisno o komplementu) s time da timoglobulin ima izraženiji učinak u odnosu na ATG-F, ali se ništa ne zna o njihovom direktnom učinku na transplantirani organ, npr. bubreg (Brennan i sur., 1999).

Timoglobulin, koji je korišten u ovom radu, smjesa je protutijela koja prepoznaju antigene kao što su: CD2, CD3, CD4, CD8, CD11a, CD18, CD25, HLA DR i HLA razred I (Bourdage i Hamlin, 1995). Osim toga, timoglobulin smanjuje izražaj adhezijskih molekula endotelnih stanica kao što su: ß1 i ß2 integrini, unutarstanična adhezijska molekula 1 (engl. *intercellular adhesion molecule 1*, ICAM1 poznata i pod nazivom CD54), adhezijska molekula stanica žila 1 (engl. *vascular cell adhesion molecule 1*, VCAM-1), adhezijska molekula 1 trombocita i endotelnih stanica (engl. *platelet endothelial cell adhesion molecule 1*, PECAM-1) te CD11b i CD62E. Smanjenje izražaja ovih adhezijskih molekula dovodi do smanjenja infiltracije imunoloških stanica u transplantirani bubreg (Yokota i sur., 2002.; Luscinskas i sur., 2002.; Chappell i sur., 2006.). Imunosupresivni mehanizam djelovanja timoglobulina također uključuje smanjenje sinteze citokina (IL-1, IL-6 i TNF-α engl. *tumor*

necrosis factor α – čimbenik nekroze tumora α) (Beiras-Fernandez i sur., 2009.; Charpentier, 2002.). Pokazano je da timoglobulin smanjuje broj apoptotičnih stanica i veličinu oštećenja skeletnog mišića nakon ishemije. Nije pokazano smanjuje li se smrtnost stanica zbog djelovanja timoglobulina direktno na stanice, ili zbog smanjenja medijatora upale (Beiras-Fernandez i sur., 2004.).

1.2. Hipoteza

Timoglobulin izravno djeluje na stanice HEK-293 i smanjuje hipoksično-reoksigenacijsko oštećenje tih stanica.

1.3. Ciljevi istraživanja

Opći ciljevi ovog istraživanja će pokazati učinak timoglobulina u hipoksično-reoksigenacijskom oštećenju stanica HEK-293.

Specifični ciljevi ovog istraživanja su sljedeći:

a) pokazati vezanje timoglobulina na stanice HEK-293

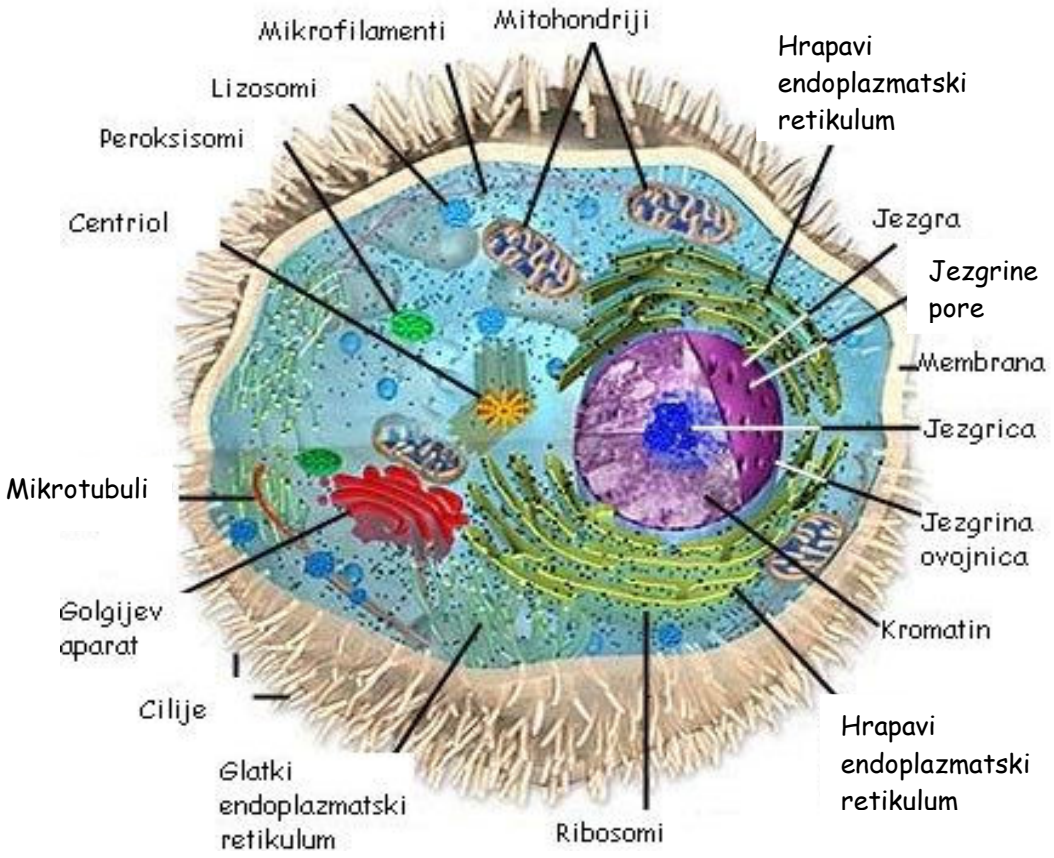
b) dokazati biološki učinak timoglobulina na stanice HEK-293 mjerenjem membranskog potencijala (metoda prikovanih potencijala) u ovisnosti o:
   - koncentraciji
   - početnom membranskom potencijalu

c) pokazati učinak timoglobulina u normoksičnim uvjetima te nakon hipoksično-reoksigenacijskog oštećenja (s komplementom i bez njega) na:
   - smrtnost stanica (Trypan blue test)
   - migracija stanica u kulturi (test grebanja)

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Stanica i čimbenici koji oštećuju stanicu

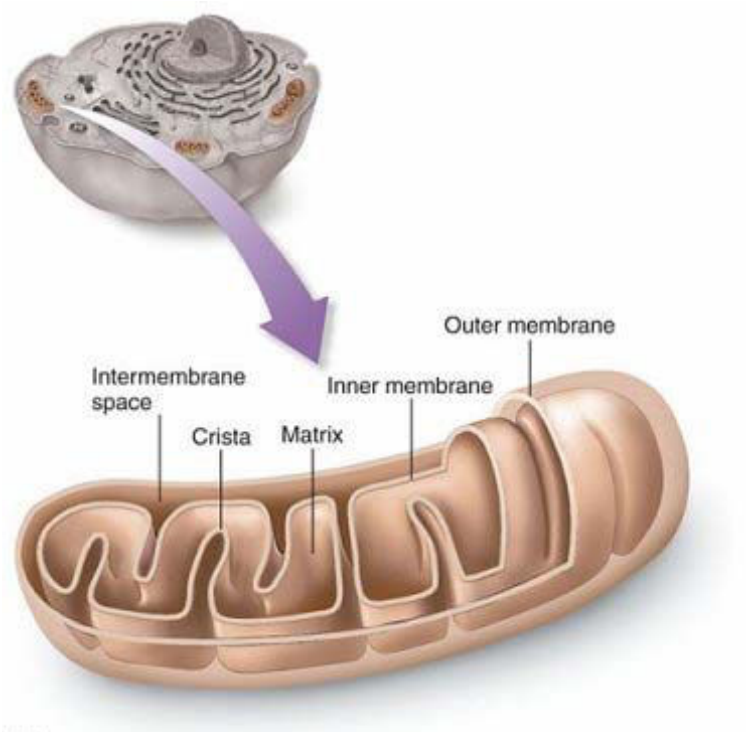
Stanica je osnovna strukturna i funkcionalna jedinica svih poznatih organizama (slika 1.). Često se naziva i "građevnom jedinicom života". Ispunjena je citoplazmom u kojoj se nalaze organele i ovijena je polupropusnom staničnom membranom. Unutar stanice nalazi se jezgra koja sadrži kromosomski materijal.



Slika 1. Životinjska stanica
(modificirano prema www.microscopy.fsu.edu/cell/animals/images/)

Stanična membrana ovija stanicu i omogućuje njen kontakt s okolišem. Debljina stanične membrane je 8 nm. Struktura stanične membrane je objašnjena modelom "tekućeg mozaika". Građena je od dvosloja fosfolipida kroz koji se protežu površinske i druge bjelančevine, čiji se raspored može mijenjati ovisno o fiziološkom stanju. Transport tvari u stanicu odvija se pasivnom difuzijom preko membrane - izravnim prolazom vode, kisika i ugljičnog dioksida, olakšanom difuzijom koja se temelji na razlici u koncentraciji (glukoza i aminokiseline), aktivnim prijenosom odnosno kretanjem protiv gradijenta koncentracije uz potrošnju ATP-a (nabijeni ioni i elektroliti) i pinocitozom, odnosno uvrtanjem membrane (npr. bjelančevine i nukleinske kiseline).

Mitohondriji su okrugle ili duguljaste organele promjera oko 0,5 µm i duge do nekoliko µm, a "zaduženi" su za stanično disanje (slika 2.). Mitohondriji su građeni od lipida, bjelančevina, nekoliko molekula kružne DNA, RNA i ribosoma. Ovijeni su dvjema membranama između kojih je međuprostor. Površina unutarnje membrane je puno veća od površine vanjske membrane i stvara nabore, tj. grebene koji su bitni u procesu staničnog disanja. Unutrašnjost mitohondrija ispunjava matriks koji čini osnovnu supstancu mitohondrija.



Slika 2. Građa mitohondrija (preuzeto s www.yellowtang.org/images/mitochondria 784.jpg)

Mitohondriji su energetske centrale stanice u kojima se stvara najveći dio ATP-a. U procesu staničnog disanja glikolizom nastaju dvije molekule ATP-a, u ciklusu limunske kiseline (Krebsov ciklus) nastaju dvije molekule ATP-a (u matriksu mitohondrija), a oksidativnom fosforilacijom nastaju 32 molekule ATP-a na membanskim naborima tj. na kristama mitohondrija. Razgradnjom jedne molekule glukoze, procesom aerobnog mitohondrijskog disanja, nastaje dakle 36 molekula ATP-a (Cooper, 2000.).

Endoplazmatska mrežica (endoplazmatski retikulum) je membranska struktura koja se proteže od jezgre do stanične površine. Razlikujemo hrapavu endoplazmatsku mrežicu, koja na svojoj površini ima ribosome, i glatku endoplazmatsku mrežicu koja na svojoj površini nema ribosome. Značajna je njena uloga u sintezi bjelančevina (proteina) upravo zbog ribosoma. Golgijev aparat je složeni niz međusobno povezanih cjevčica, mjehurića i cisterni. Smatra se da barem dio Golgijevog aparata nastaje iz endoplazmatske mrežice i to odvajanjem mjehurića. Primarni lizosomi, koji sadrže probavne enzime, odvajaju se s ruba Golgijevog aparata i razgrađuju tvari koje ulaze u stanicu, pa sudjeluju u staničnoj samoprobavi i sekreciji. Spajanjem primarnih lizosoma i drugih mjehurića (onih nastalih pinocitozom) nastaju sekundarni lizosomi. Golgijev aparat je posebice razvijen u stanicama za izlučivanje. Ribosomi su citoplazmatske strukture veličine 15 - 20 μm. Na njima se sintetiziraju bjelančevine. Građeni su od dviju podjedinica, male i velike, a mogu biti vezani na endoplazmatsku mrežicu ili su slobodni u citoplazmi.

Jezgrina ovojnica odvaja sadržaj jezgre od citoplazme. U vrijeme stanične diobe ona se u većini stanica raspada i ponovno formira. Građena je od dviju membrana koje su međusobno odvojene perinuklearnim prostorom. Unutarnja je membrana vezana uz kromatin, a vanjska je nastavak citoplazmatske endoplazmatske mrežice i na taj način čini kontinuitet jezgre i citoplazme. Neprekinuta komunikacija između jezgre i citoplazme se odvija kanalićima koji se zovu jezgrine pore. Sadržaj jezgre, koji se dobro boji karminom i sličnim bojama, naziva se kromatin, a čine ga DNA i bjelančevine. Spiralizacijom, kromatin stvara kromosome. Jedna molekula DNA stvara jedan kromosom.

Jezgra je upravljački centar stanice. Jezgra sadrži nasljednu uputu. Tijekom diobe stanice kromosomi se raspoređuju u stanice kćeri. Tjelesne stanice se dijele mitozom i nastaju dvije stanice kćeri s 2n brojem kromosoma. Spolne stanice nastaju mejozom i od jedne stanice nastaju četiri stanice kćeri s n brojem kromosoma. Dioba stanice predstavlja kratko razdoblje života stanice, a razdoblje između dioba naziva se interfaza. U interfazi se DNA udvostručuje (Berns, 1997.; Alberts i sur.,1983.).

Normalna stanica prilagođava svoju funkciju i građu promjenljivim zahtjevima i oštećenjima. Ukoliko se stanica suoči s prekomjernim fiziološkim utjecajima ili djelovanjem patoloških čimbenika, ona se može prilagoditi. Prilagodbom stanice na nepovoljne utjecaje poprima stabilno, ali poremećeno stanje, koje osigurava opstanak i funkcioniranje stanice unatoč djelovanju nepovoljnih čimbenika.

Postoje brojni čimbenici (Kumar i sur., 2000.) koji mogu oštetiti funkciju stanice:

- hipoksija
- kemikalije i lijekovi
- fizikalni uzroci
- mikrobiološki uzroci
- imunološke reakcije
- genetski nedostatci
- poremećaj prehrane
- starenje

2.1.1. Hipoksija

Hipoksija (lat. hypoxia) je stanje smanjene količine kisika u stanicama i tkivu. Posljedica smanjenja količine kisika može biti poremećaj u funkcioniranju stanica, organa i organskih sustava (Guyton i Hall, 2012.). Hipoksija može nastati kao posljedica smanjenja ili gubitka dotoka krvi u tkivo arterijama ili odplavljivanja krvi iz tkiva venskom drenažom. Uzroci mogu biti bolesti krvnih žila ili stvaranje krvnih ugrušaka, kao i nedovoljna opskrba kisikom uzrokovana zatajivanjem kardiorespiratornog sustava (bolesti srca i pluća). Hipoksija se može javiti i zbog bolesti krvi kada je smanjen oksigenacijski kapacitet npr. kod anemija ili trovanja ugljičnim monoksidom (Tomei i Cope, 1991.).

2.1.2. Kemijske tvari i lijekovi

Svaka kemijska tvar ili lijek koji se unese u organizam može igrati važnu ulogu u procesu stanične prilagodbe, oštećenja stanice ili smrti stanice. Kemikalije mogu djelovati na propusnost membrana, osmotsku homeostazu ili građu i funkciju enzima.

2.1.3. Fizikalni uzroci

Nagle promjene atmosferskog tlaka, ekstremna toplina ili hladnoća, energija zračenja ili električna energija, kao i mehaničko oštećenje, djeluju na funkciju stanice (Ivančević, 2010.; Kovač, 1990.).

Dugotrajno djelovanje sniženog atmosferskog tlaka u organizmu pokreće niz adaptacijskih odgovora (Ryles i Pilmanis, 1996). U krvi se povećava broj eritrocita i na taj se način povećava transportni kapacitet prijenosa kisika. Mijenjanje disocijacijske krivulje hemoglobina dovodi do lakšeg otpuštanja kisika na periferiji. Akutno izlaganje sniženom atmosferskom tlaku u visinskim uvjetima doprinosi dekompenzacijskom stanju. Takvo stanje je praćeno brojnim simptomima, kao što su glavobolja, mučnina, povraćanje, psihomotorna usporenost, umor, a ponekad i euforija. Snižavanjem atmosferskog tlaka i posljedičnim povećavanjem frekvencije i dubine disanja, (hiperventilacija) dolazi do alkaloze, koja uzrokuje omaglicu, smetenost, parestezije, grčeve, sinkopu i na kraju smrt.

Izlaganjem velikoj količini kisika nastaje trovanje kisikom zbog stvaranja slobodnih kisikovih radikala. Naglim snižavanjem tlaka okoline, kod osoba koje su bile izložene povišenom atmosferskom tlaku, može se razviti dekompresijska bolest. Boravkom u uvjetima visokog tlaka dolazi do otapanja velike količine inertnog dušika u tjelesnim tekućinama. Brzim snižavanjem vanjskog tlaka dolazi do oslobađanja dušika u obliku mjehurića u tkivima i tjelesnim šupljinama. Rezultat tih procesa mogu biti bolovi u mišićima, embolija mjehurićima plina i smrt.

Toplina se u tijelu stvara metabolizmom i zagrijavanjem iz okoliša. Tijelo može kompenzirati velike varijacije u toplini okoliša. Duže izlaganje povišenoj vanjskoj toplini povećava unutarnju temperaturu. Umjerena prolazna povišenja unutarnje temperature su podnošljiva. Dugotrajnija ili jaka povišenja temperature dovode do denaturacije bjelančevina, otpuštanja upalnih citokina (TNF-α, IL-1β) pa dolazi do stanične disfunkcije, aktivacije upalne kaskade i aktivacije koagulacijske kaskade. Patofiziološka zbivanja su slična onima u multiorganskom zatajenju.

Izlaganje tijela niskoj temperaturi dovodi do hipotermije, ozeblina i smrzotina. Hipotermija nastaje kad je poremećena ravnoteža između toplinske energije nastale metabolizmom i njezinog pretjeranog gubitka. Hipotermija usporava sve fiziološke funkcije. To se odnosi na funkciju srčanožilnog i dišnog sustava. Usporava se provođenje živčanog impulsa, vrijeme neuromuskularne reakcije i metabolizam. Ozebline su lokalna akutna oštećenja kože i potkožnog tkiva prouzrokovana hladnoćom. Najčešće su zahvaćeni periferni dijelovi tijela (uške, nos, prsti na šakama i stopalima). Smrzotine označavaju smrzavanje pojedinih dijelova tijela uslijed snižavanja tjelesne temperature ispod 35°C. Zbog snižene temperature dolazi do oštećenja krvnih žila, prekida cirkulacije i tromboze. Do toga dolazi i izravnim oštećenjem hladnoćom (Naranscik, 1990).

Ozljede nastale električnom energijom ovise o naponu, otporu i vremenu njenog djelovanja. Prirodu ozljede određuje put struje kroz tijelo. Prolaskom struje kroz tijelo dolazi do stvaranja topline i oštećenja koje se naziva elektrotermijskim oštećenjem. Ometanjem membranskog potencijala na stanicama nastaje elektrospecifično oštećenje. Električna energija može uzrokovati poremećaj srčanog ritma ili dovesti do srčanog zastoja. U krvnim žilama prolazak struje može uzrokovati zgrušavanje ili hemolizu krvi, te dovesti do oštećenja svih slojeva krvne žile. Prolazak struje kroz mozak uzrokuje trenutni gubitak svijesti, grčeve ili kljenut centra za disanje. Oštećenja kože mogu biti u obliku blagih opeklina do karbonizacije. U mišićima dolazi do razaranja mišićnih vlakana i koagulacijske nekroze mišića. U plućima dolazi do edema, emfizema, petehijalnih krvarenja, žarišne nekroze i upale (Taradi, 1990).

Ionizirajuće zračenje oštećuje mRNA, DNA i proteine izravno ili stvaranjem vrlo reaktivnih slobodnih radikala. Niže doze ometaju proliferaciju stanica, dok visoke doze dovode do nekroze stanica. Genetska oštećenja uzrokovana ionizirajućim zračenjem mogu dovesti do malignih transformacija ili prijenosa gentskog defekta. Na oštećenja zračenjem su posebno osjetljiva tkiva koja se kontinuirano i brzo obnavljaju. Najosjetljiviji su limfociti, spolne stanice, proliferacijske stanice koštane srži, crijevne epitelne stanice, hepatociti, epitelne stanice bubrega i živčane stanice. Razina zračenja na kojoj počinje toksični učinak ovisi o vremenskim intervalima zračenja. Jednokratna doza čini više štete nego ista doza koja je podijeljena na više frakcija tijekom dužeg razdoblja (Deanović, 1990.).

2.1.4. Mikrobiološki uzroci oštećanja stanice

U infektivne agense koji uzrokuju oštećenje stanica i tkiva spadaju virusi, bakterije i gljive. Infektivni agens može izazvati izravnu smrt stanice dodirivanjem stanice ili ulaskom u nju. Do oštećenja funkcije stanice ili njene smrti može doći i oslobađanjem toksina koji oslobađa infektivni agens, kao i izlučivanjem enzima koji razgrađuju tkiva ili oštećuju krvne žile čime uzrokuju ishemijsku nekrozu. Infektivni agens može izazvati stanični odgovor domaćina, te može doći do dodatnog oštećenja tkiva uzrokovanog imunološkim mehanizmima (Levinson, 2012.).

Virusi ulaze u stanicu domaćina i razmnažaju se na njegov račun. Vezno mjesto na površini stanice domaćina su proteini koji se nazivaju receptori, a virusi se na njega vežu pomoću specifičnih površinskih proteina koji se nazivaju ligandi. Ulaskom u stanicu domaćina, virus gubi svoju ovojnicu i odvaja genom od strukturnih komponenti. Umnažanje virusa se događa djelovanjem enzima karakterističnih za svaku vrstu (RNA virusi koriste RNA polimerazu, a DNA virusi reverznu transkriptazu) i enzima domaćina. Novostvoreni viralni genomi i proteini kapside spajaju se u progenitor viriona u jezgri ili citoplazmi. Iz stanice se otpuštaju direktno ili pupanjem kroz staničnu membranu. Virusi ubijaju stanice domaćina inhibicijom sinteze DNA, RNA ili bjelančevina domaćina. Integriranjem u staničnu membranu direktno oštećuju njezin integritet ili potiču fuziju stanica. Eksplozivno umnažanje virusa u epitelnim stanicama respiratornog sustava dovodi do direktne lize. Virusi mogu oštetiti stanice koje sudjeluju u obrani organizma od mikroba. Na taj je način otvoren put sekundarnoj infekciji (HIV dovodi do deplecije $CD4^+$ pomoćničkih limfocita, čime je otvoren put oportunističkim infekcijama).

Bakterije oštećuju stanice domaćina ovisno o njihovoj sposobnost vezivanja za stanice domaćina i proizvodnje toksina. Većina bakterijskih infekcija započinje adherencijom patogenih bakterija na sluznice ljudskog organizma. Bakterije naseljavaju i koloniziraju sluznice dišnog, probavnog, spolnog ili mokraćnog sustava ukoliko uspješno izbjegnu brojne nespecifične obrambene mehanizme. Ti su mehanizmi kihanje, kašljanje, peristaltika i sekreti koji neprekidno ispiru sluznice. Patogeneza mnogih bakterijskih infekcija temelji se na djelovanju toksina, bilo lokalnom na mjestu infekcije, bilo udaljenom, nakon transporta bakterijskog toksina s mjesta infekcije. Ukoliko bakterije izlučuju toksine izvan bakterijske stanice (rjeđe ih skladište u periplazmatskom prostoru), ti se toksini nazivaju egzotoksini. Toksini, koji su dio stanične stjenke Gram-negativnih bakterija nazivaju se endotoksini.

Egzotoksini su produkti različitih Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija i ubrajaju se među najtoksičnije poznate supstancije. Budući da je riječ o polipeptidima, egzotoksini su dobri antigeni i induciraju sintezu protektivnih protutijela koja se nazivaju antitoksini i imaju kliničku primjenu u prevenciji i liječenju bolesti. Izlaganjem djelovanju formaldehida, kiselina ili visokih temperatura, egzotoksini postaju neškodljivi i nazivaju se toksoidi ili anatoksini i upotrebljavaju se u svrhu aktivne imunizacije kao cjepiva.

Bakterijski toksini mogu se razlikovati i prema mjestu njihova djelovanja, pa se neki egzotoksini nazivaju neurotoksinima, dermotoksinima ili enterotoksinima, ovisno o tome je li mjesto njihova djelovanja živčani sustav, koža ili crijevo. Stanična oštećenja izazvana permeabilnošću stanica, obično rezultiraju oslobađanjem citokina, aktivacijom intracelularnih proteaza, indukcijom apoptoze i u konačnici smrti stanice. Vežu se na ljudske eritrocite, monocite, trombocite, limfocite i endotelne stanice, što dovodi do rupture membrane ovih stanica, njihove lize i smrti (Brudnjak, 1990).

2.1.5. Imunološke reakcije

Imunološki sustav razlikuje strano od vlastitog i odstranjuje potencijalno štetne strane molekule i stanice iz organizma. Imunološki sustav ima sposobnost prepoznavanja i uništavanja vlastitih, promjenjenih stanica. Prije nego se aktivira imunološki sustav, vanjski antigeni moraju nadvladati prirodne anatomske barijere, a to su koža i sluznica dišnog, probavnog i urogenitalnog sustava. One predstavljaju vanjsku zaštitu organizma. Otpornost na vanjske antigene se naziva imunitet. Imunitet može biti prirodan ili nespecifičan i stečen ili specifičan (Andreis, 2004.).

Prirodna otpornost ne zahtjeva prethodni kontakt s antigenom radi aktivacije imunološkog sustava. Komponente prirodne imunosti su fagocitne stanice, stanice koje predočuju antigen, prirođene ubilačke stanice i polimorfonuklearni leukociti. Fagocitne stanice su neutrofili i monociti u krvi te makrofagi i dendritične stanice u tkivima. One fagocitiraju strane antigene. Stanice koje predočuju antigen su makrofagi i dendritične stanice. One predočuju fragmente fagocitiranih antigena T limfocitima. Prirođene ubilačke stanice uništavaju stanice zaražene virusom. Polimorfonuklearni leukociti (eozinofili, bazofili, mastociti) otpuštaju medijatore upale i sudjeluju u aktivaciji imunološkog sustava.

Stečena otpornost (imunost) pamti prethodno izlaganje (kontakt) i specifična je za antigen. Komponente te imunosti su protutijela, T i B-limfociti. Odgovor T-limfocita na antigen naziva se stanična (celularna) imunost, a odgovor B-limfocita naziva se humoralna imunost, budući da B-limfociti luče topljiva protutijela za dotični antigen. Uspješna obrana organizma imunološkim sustavom podrazumijeva aktivaciju, regulaciju i iščezavanje imunološke reakcije. Imunološki se sustav aktivira kada cirkulirajuće protutijelo ili receptori na stanici prepoznaju strani antigen. Nakon što je antigen, kompleks antigen-antitijelo ili kompleks komplement-mikroorganizam prepoznat, biva fagocitiran. Ukoliko izostane brza fagocitoza i potpuna razgradnja antigena, dolazi do aktivacije stečene imunološke reakcije. Aktivacija može započeti u slezeni za cirkulirajuće antigene, u regionalnim limfnim čvorovima za tkivne antigene, te u limfatičnim tkivima sluznica za mukozne antigene.

Peptidi podrijetlom iz antigena izlažu se na površini predočnih stanica unutar molekula klase II-MHC sustava (glavnog sustava tkivne podudarnosti) koje predočavaju peptid CD4 pozitivnom pomoćničkom T- limfocitu. Kada se pomoćnički T limfociti vežu uz kompleks, stanica eksprimira receptore za interleukin 2 (IL-2) i secernira nekoliko vrsta citokina.

Podvrsta T-pomoćničkih limfocita (TH1) izlučuje interferon-γ (INF-γ), IL-2 i limfotoksin koji olakšavaju odgovor makrofaga i citotoksičnih T-limfocita. Druga vrsta pomoćničkih limfocita (TH2) izlučuju IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 i IL-13 koje stimuliraju B-limfocite na stvaranje protutijela. Za razliku od molekula klase II glavnog sustava tkivne snošljivosti koje predočuju izvanstanične antigene $CD4^+$ TH -limfocotima; molekule klase I MHC sustava predočuju unutarstanične antigene (npr.viruse) $CD8^+$ citotoksičnim T-limfocitima. Aktivirani citotoksični T-limfocit zatim ubija zaraženu stanicu.

Imunološki sustav mora biti pod kontrolom regulatornih mehanizama da bi se spriječila oštećenja domaćina (anafilaktična reakcija ili difuzno razaranje tkiva). Regulacijske T stanice luče imunosupresivne citokine, kao što su IL-10 i transformirajući faktor rasta-β (TGF-β) kao i druge nedovoljno istražene čimbenike koji priječe autoimuni odgovor. Imunološka reakcija završava odstranjenjem antigena iz organizma. U nedostatku antigena, prestaje sekrecija citokina, a aktivirani citotoksični T-limfociti ulaze u proces programirane stanične smrti – apoptoze. T i B-limfociti koji su se diferencirali kao memorijske stanice pošteđeni su u apoptoze.

Nakon unosa stranih proteina u organizam anafilaktična reakcija može se razviti do oštećenja stanica. Autoimune se bolesti razvijaju zbog reakcije imunološkog sustava endogenim autoantitijelima.

2.1.6. Genetski poremećaji

Genetski poremećaj može dovesti do velikih oštećenja, kao što su kongenitalne malformacije (npr. Dawnov sindrom) ili do jedva zamjetnih poremećaja u građi bjelančevina (stvaranje hemoglobina S kod anemije srpastih stanica).

2.1.7. Poremećaj prehrane

Opće je poznato da se energija potrebita za obavljanje različitik tjelesnih funkcija osigurava svakodnevnim unošenjem raznih vrsta hrane. Ukoliko se unešena energija ne potroši, može se pohraniti za kasniju uporabu. Ukoliko je unos hrane preobilan i unešena energija je veća od potrošnje, suvišak energije se pohranjuje pretežno u obliku masti. Posljedica toge je povećanje tjelesne mase i pretilost. Ukoliko je unos energije nedostatan za metaboličke potrebe, čovjek gladuje, a tjelesna mu se masa smanjuje. Prehrana mora biti bogata bjelančevinama, ugljikohidratima, mastima, mineralima i vitaminima. Uravnotežena prehrana omogućuje opskrbu svih dijelova metaboličkih sustava potrebnim tvarima. Manjak hranjivih tvari kao što su manjak bjelančevina, avitaminoze ili prekomjerna prehrana hranom bogatom mastima životinjskog podrijetla uzrokuje aterosklerozu, debljinu i bolesti srčano žilnog sustava.

2.1.8. Starenje

Starenjem progresivno slabe mnoge stanične funkcije. Zbog starenja mitohondrija smanjuje se oksidativna fosforilacija. Nadalje, starenjem se smanjuje sinteza strukturnih i enzimatskih proteina, kao i staničnih receptora. Ostarjele stanice imaju smanjenu sposobnost unošenje hrane i popravka kromosomskih oštećenja.

Postoji više teorija kojima se nastoji protumačiti starenje stanice. Teorija „trošenja“ govori da je proces starenja posljedica neposredne izloženosti neprijateljskim egzogenim utjecajima koji uzrokuju progresivno slabljenje sposobnosti stanice za preživljenje. Druge teorije tumače da je starenje posljedica unutrašnjih osobina stanice koje su uvjetovane genetskim čimbenicima. Teorija somatskih mutacija govori o tome da dolazi do pogreške u replikaciji DNA, koja se ne popravlja precizno pa to utječe na preživljenje stanice. Hipoteza programiranog starenja obuhvaća unaprijed određen slijed događaja koji uzrokuje starenje. Hipoteza ograničenog dijeljenja stanica govori da je starenje uvjetovano genetski programiranim brojem dijeljenja, nakon čega se prestaju dijeliti, tj postaju nesposobne za obnavljanje (Šprung i Marušić;1990.).

2.2. Mehanizmi staničnog oštećenja

Za neke uzročnike oštećenja je mehanizam i mjesto djelovanja dobro definirano. Za mnoge uzročnike još nije poznat način štetnog djelovanja. Međuovisnost organela, biokemijskih sustava, enzimatskih sustava, kao i brojnih makromolekula, toliko je isprepletena da je teško razlikovati mjesto primarnog oštećenja od sekundarnih promjena koje slijede primarno oštećenje. Također je vrlo teško odrediti „točku“ na kojoj su se dogodile promjene nakon kojih više nema oporavka stanice i nakon kojih slijedi niz procesa i događanja koji završavaju smrću stanice.

Manjak kisika pokreće niz oštećenja stanica u ishemiji. Zbog manjka kisika prvo stradava aerobna respiracija stanice, odnosno oksidativna fosforilacija u mitohondrijima. Usporava se ili prestaje proizvodnja ATP-a. Manjak ATP-a djeluje na smanjenu aktivnost adenozin trifosfataze stanične membrane. Zbog zatajivanja natrijske crpke dolazi do nakupljanja natrija u stanicama i izlaska kalija u izvanstanični prostor. Zbog suviška natrija, voda izoosmotskim putem ulazi u stanice i uzrokuje njihovo bubrenje.

Da bi se održali stanični izvori energije, iz glikogena se djelovanjem enzima fosfofruktokinaze stvara ATP. Glikogenolizom se uz stvoreni ATP, nakuplja i mliječna kiselina i anorganski fosfati. Na taj se način smanjuje unutarstanični pH. Daljnjim trajanjem hipoksije dolazi do otpadanja ribosoma sa zrnatog endoplazmatskog retikuluma i raspadanja poliribosoma u monosome.

Nastavljenjem hipoksije dolazi do daljnjeg oštećenja membranske permeabilnosti i do oštećenja funkcije mitohondrija. Na površini stanice se mogu stvarati mjehurići. Od stanične membrane i membrana organela stvaraju se „mijelinske figure“ (koncentrično poredane lamele). Mitohondriji u to vrijeme mogu izgledati normalno, lagano nabubreni ili zgusnuti, endoplazmatski retikul je proširen, a cijela stanica je nabubrena.

Ukoliko se uspostavi oksigenacija, opisane promjenje su popravljive (reverzibilne), a ukoliko se ishemija nastavi, događaju se oštećenja koja su nepopravljiva (ireverzibilna). Rezultat nepopravljivih oštećenja stanice je smrt stanice. Morfološki se ireverzibilna oštećenja očituju jakom vakuolizacijom mitohondrija, uključujući njihove kriste, opsežnim oštećenjima staničnih membrana, bubrenjem lizosoma, te ulaskom kalcija u stanice, ukoliko se ishemična zona prožme krvlju. U matriksu mitohondrija stvaraju se zgusnuća građena od amorfnog kalcija. Zbog hiperpermeabilnosti membrana događa se trajan gubitak bjelančevina, esencijalnih koenzima i ribonukleinskih kiselina. Iz stanica se mogu izgubiti i metaboliti potrebiti za obnavljanje ATP-a, a to dovodi do daljnjeg iscrpljivanja unutarstaničnih visokoenergijskih fosfata. Snižavanjem unutarstaničnog pH, oštećuju se membrane lizosoma s posljedičnim otpuštanjem njihovih enzima u citoplazmu, aktivaciju lizosomskih enzima i enzimatsku digestiju citoplazmatskih i jezgrinih komponenta.

U procesu umiranja stanice, stanični se elementi brzo raspadaju, a stanični enzimi cure u vanstanični prostor, pa molekule vanstaničnog prostora ulaze u mrtve stanice. Mrtva stanica, na kraju, bude nadomještena velikim masama fosfolipida u obliku „mijelinskih figura“. Fosfolipide fagocitiraju druge stanice ili se raspadaju u masne kiseline (Kovač, 1990.).

Opisan je slijed događanja, od ishemijskog oštećenja do konačnog oštećenja, koji vodi do smrti stanice. Teško je, a ponekad i nemoguće, odrediti „točku“ u kojoj je započeo ireverzibilni proces s kojeg nema povratka. Dva su elementa ireverzibilnosti. Prvi je nesposobnost da se popravi disfunkcija mitohondrija, usprkos ponovnom dotoku krvi i oksigenaciji. Drugi element je razvoj teških poremećaja u funkciji membrane (Guyton, 2012.).

2.3. Hipoksično-reoksigenacijsko oštećenje

Ukoliko se, nakon određenog vremena ishemije, ponovno dogodi reperfuzija organa i ponovna oksigenacija, dolazi do brojnih zbivanja u stanici koja se nazivaju hipoksično-reoksigenacijsko oštećenje. Pod tim se pojmom podrazumijevaju brojni patofiziološki događaji nakon reperfuzije organa ili tkiva koji su prethodno bili izloženi određenom razdoblju ishemije tj. hipoksije, odnosno prestanku krvnog protoka kroz organ (McCord, 1985.).

Uspostavom protoka krvi i ponovne oksigenacije dolazi do ispravka energijskih i strukturnih poremećaja, ali se pokreću i štetni procesi. Pritom dolazi do dodatnog oštećenja stanica koje su u razdoblju ishemije bile samo reverzibilno oštećene. Hipoksično-reoksigenacijsko oštećenje pridonosi morbiditetu i mortalitetu u stanjima kao što su infarkt miokarda, moždani udar, ishemija crijeva, bolesti perifernih krvnih žila, hipovolemijski šok i stanja nakon presadnje (transplantacije) organa.

Patogeneza hipoksično-reoksigenacijskog oštećenja je složena i u njoj sudjeluje mnogo čimbenika, kao što su suvišak slobodnih radikala kisika, aktivacija neutrofila, aktivacija komplementa, citokini i drugi upalni posrednici i vazoaktivne tvari, dušikov oksid (NO) i endotelin. Posljedice hipoksično-reoksigenacijskog oštećenja mogu biti u rasponu od minimalnih funkcionalnih i strukturnih oštećenja i reverzibilne disfunkcije jednog organa do zatajenja mnogih organa (MODS, engl. *multiple organ dysfunction syndrome*) i smrti (Bown i sur., 2001.).

2.3.1. Stanični učinci hipoksije

Potpuni (anoksija) ili nedostatan (hipoksija) protok krvi kroz tkivo onemogućuje, odnosno smanjuje, opskrbu tkiva kisikom. Nedostatan protok krvi također smanjuje dopremu hranjivih tvari i uzrokuje sporije odstranjenje metaboličkih produkata. Hipoksija se očituje na svim staničnim dijelovima i funkcijama (Krvavica i Gamulin, 2002.). Zbog manjka energije stradavaju stanični transportni procesi, posebice oni koji održavaju razliku u koncentraciji tvari unutar stanice i izvan nje. Manjak energije dovodi do slabljenja Na-K crpke zbog čega se natrij nakuplja unutar stanice. Posljedično se u stanici nakupljaju ioni Ca^{2+} i voda. Rezultat takvog nakupljanja je edem stanice. Nakupljenje kalcijevih iona je i posljedica usporenja Ca^{2+} crpke na staničnoj membrani i endoplazmatskoj mrežici.

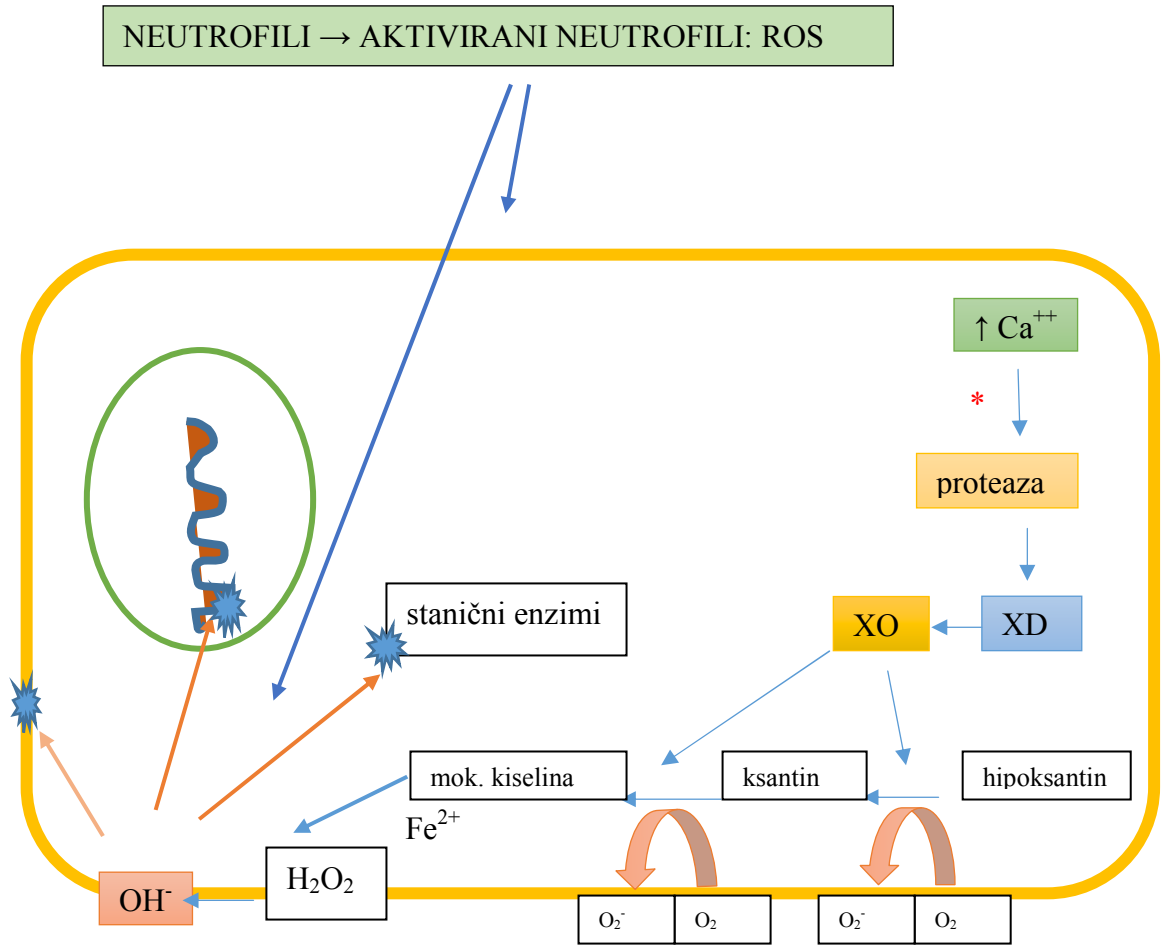
Porast unatarstanične koncentracije iona Ca^{2+} dovodi do niza potencijalno štetnih događanja za stanicu (Krvavica i Gamulin, 2002.). Manjak energije i porast unutarstanične koncentracija Ca^{2+} su ključni čimbenici poremećaja funkcije mitohondrija zbog stvaranja pora na membranama mitohondrija (Gamulin i sur., 2002a.; Hoffman i sur., 2004.). Pojavom pora na membranama mitohondrija povećava se propusnost što dovodi do gubitka elektrokemijskog gradijenta H^+ i raskida oksidativne fosforilacije. U fiziološkim se uvjetima u mitohondrijima kisik gotovo u potpunosti reducira do vode.

Manja količina kisika se nepotpuno reducira do superoksidnog aniona (O^{2-}) iz kojeg nastaju drugi slobodni kisikovi radikali. U uvjetima hipoksije u mitohondrijima dolazi do povećanog stvaranja superoksidnog aniona (O^{2-}). To nadmašuje njihovo uklanjanje (Krvavica i Gamulin, 2002.; Halliwell, 1995.). Pore koje se stvaraju u mitohondrijskim membranama dovode do izlaska iona Ca^{2+} i bjelančevina iz mitohondrija i ulaska vode. Produženo postojanje pora dovodi do nepovratnog oštećenja mitohondrija i stanice. Ca^{2+}, sam ili u kompleksu sa kalmodulinom, aktivira različite enzime - proteaze i nukleaze.

Jedan od enzima koji aktivira Ca^{2+} je i proteaza koja cijepa enzim ksantin dehidrogenazu i pretvara ga u ksantin oksigenazu. Ksantin oksigenaza je važan enzim purinskog metaboličkog puta, jer katalizira oksidaciju hipoksantina i ksantima do mokraćne kiseline. U stanicama, u fiziološkim uvjetima, prevladava ksantin dehidrogenaza (90%) koja elektrone prenosi na vodik i NAD tijekom oksidacije ksantina (Krvavica i Gamulin, 2002.; McCord i sur., 1985.) U hipoksičnim uvjetima se ksantin oksigenaza nalazi u suvišku i prenosi elektrone na molekularni kisik, pri čemu nastaje slobodni radikal kisika – superoksidni anion (O^{2-}). Superoksidni anion u prisutnosti slobodnog željeza prelazi u vodikov peroksid (H_2O_2). Iz njega nastaje hidroksilni radikal (HO^-) koji je jedan od najreaktivnihjih i najtoksičnijih produkata molekularnog kisika.

Slobodni radikali kisika su vrlo reaktivne molekule. Brzo reagiraju s različitim makromolekulama i strukturama u stanici pri čemu prelaze u stabilniji oblik. Neprekidno stvaranje slobodnih kisikovih radikala i njihovo fiziološko uklanjanje unutar stanice omogućava održavanje optimalnih oksidacijsko-redukcijskih uvjeta u molekularnom mikrookolišu. Osim slobodnih radikala, postoje i drugi reaktivni oblici molekularnog kisika, a sve ih nazivamo reaktivnim kisikovim oblicima – ROS (engl. *reactive oxygen species*) (Halliwell, 1995.).

Reaktivni kisikovi oblici u patofiziološkim uvjetima mogu direktno ili indirektno oštetiti sve dijelove stanice i uzrokovati smrt stanice (slika 3.). Membrane oštećuju poticanjem njihove lipidne peroksidacije. Na taj se način mijenja struktura i funkcija membrana, od promjene fluidnosti i propusnosti, do potpune lize. Reaktivni kisikovi oblici inaktiviraju stanične enzime, oksidiraju neke aminokiseline ili cijepaju peptidnu vezu, oštećuju DNA hidroksilacijom baza u nukleinskim kiselinama i uzrokuju lomove polinukleotidnih tračaka.



Slika 3. Stvaranje slobodnih radikala kisika tijekom reperfuzije i reoksigenacije. XD-ksantin dehidrogenaza; XO – ksantinoksidaza; O_2^- - superoksidni anion; OH^- - hidroksilni slobodni radikal; * - aktivacija; - oštećenje; ROS – reaktivni kisikovi oblici

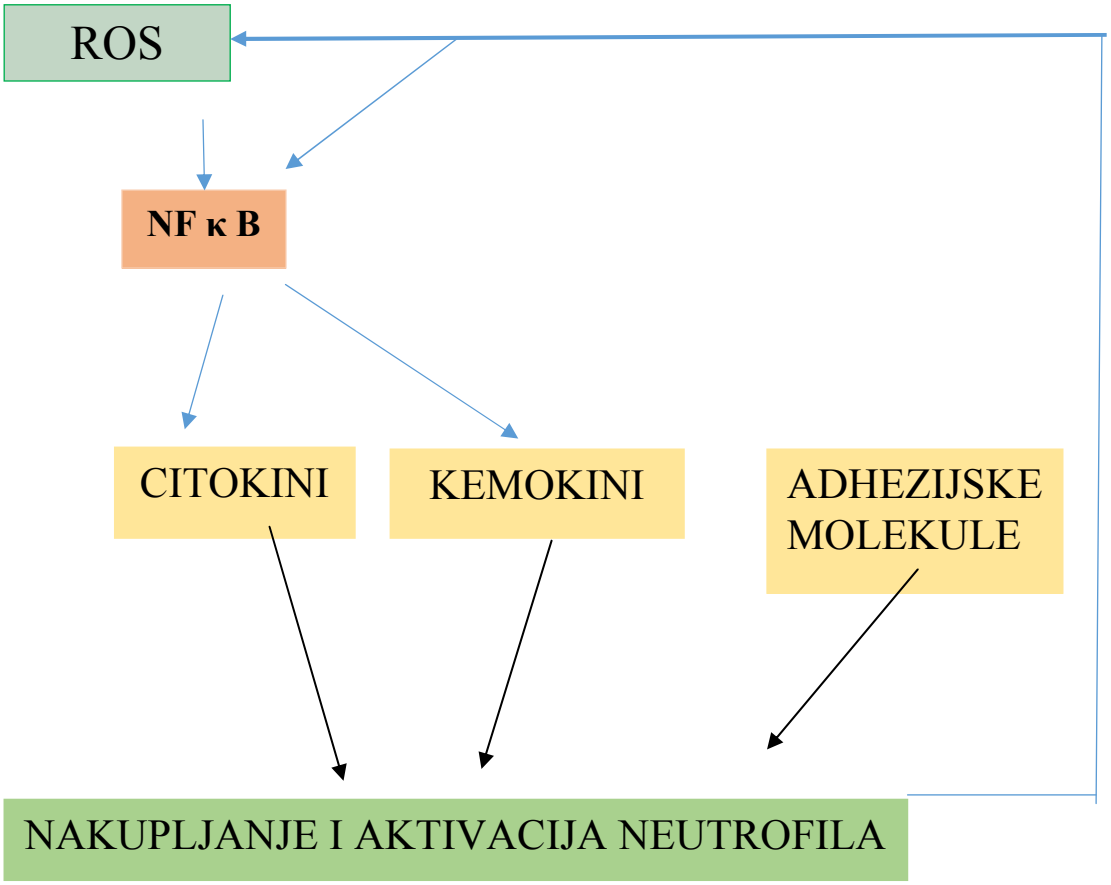
U oštećenju i eventualnoj lizi stanice pridonose i lizosomi. Hipoksija labilizira lizosome, a sniženje pH unutar stanice aktivira lizosomske enzime. Aktivirani lizosomski enzimi oštećuju stanične membrane i jezgru i razgrađuju kromatin (Krvavica i Gamulin, 2002.). Manjak energije koči procese transkripcije u jezgri kočenjem sinteze RNA. Zbog manjka energije usporava se sinteza bjelančevina i dolazi do raspadanja poliribosoma (Krvavica i Gamulin, 2002.).

2.3.2. Transkripcijski čimbenik NF-κB

Transkripcijski faktor NF-κB (nuklearni faktor kappa B) ima ključnu ulogu u regulaciji aktivacije brojnih gena. Tu spadaju geni odgovorni za produkciju čimbenika lokalne upale i čimbenika koji sudjeluju u općoj reakciji organizma na ozljedu. Reperfuzija ishemičnog tkiva dovodi do stvaranja ROS. Dokazano je da na aktivaciju NF-κB djeluju vodikov peroksid i superoksidni anion. Aktivirani NF-κB potiče ekspresiju mnogih gena čiji su produkti uključeni u upalu i bitni su za tijek hipoksično-reoksigenacijskog oštećenja. U citoplazmi stanice se NF-κB nalazi u kompleksu s inhibicijskom molekulom I-κB. Različiti čimbenici, uključujući slobodne kisikove radikale, potiču fosforilaciju I-κB i disocijaciju kompleksa inhibitorne podjedinice i transkripcijskog čimbenika NF-κB (McCord i sur., 1985.). Tako oslobođeni NF-κB odlazi u jegru gdje potiče prepisivanje gena. Produkti ekspresije tih gena su citokini npr. TNFα i IL-1, citokinski receptori, kemokini, athezijske molekule, interferon β i različiti enzimi (fosfolipaza A2, ciklooksigenaza, lipooksigenaza, inducibilna NO sintetaza) (Serracino-Inglot i sur., 2001.; Ghosh i sur., 1998.; Gamulin i sur., 2002b). Neki od proteinskih produkata tih gena djeluju na regulaciju NF-κB. Tako npr. TNFα i IL-1 aktiviraju sustav NF-κB i tako se zatvara pozitivna povratna sprega. Pojedini posrednici upale imaju brojna međudjelovanja, koja dovode do pojačanja upalne reakcije.

Uloga NF-κB u hipoksijsko-reoksigenacijskim oštećenjima pokazana je u mnogim eksperimentalnim istraživanjima (slika 4.). Primijenom inhibitora aktivacije NF-κB u eksperimentalnom modelu hipoksično-reoksigenacijskog oštećenja miokarda (na zečevima) uočeno je smanjenje ekspresije gena za upalotvorne citokine, kao i ublažavanje mehaničke disfunkcije miokarda (Yeh i sur., 2005.). U drugom istraživanju je pokazano smanjenje veličine infarkta miokarda nakon ishemije i reperfuzije u transgeničnih miševa u kojih je bila blokirana aktivnost NF-κB (Brown i sur., 2005.). U eksperimentalnom modelu hipoksijsko-reoksigenacijskog oštećenja jetre je pokazana zaštitna uloga kemijskog inhibitora NF-κB (Luedde i sur., 2005.).

Istraživana je uloga NF-κB u patogenetskim zbivanjima vezanim uz hipoksično-reoksigenacijsko oštećenje crijeva i pokazana je važnost primjene inhibitora NF-κB. Primjenom inhibitora NF-κB smanjeno je oštećenje tkiva i smrtnost eksperimentalnih životinja uzrokovana inhibicijom stvaranja TNFα i smanjenjem infiltracije neutrofilima (Souza i sur., 2005.).



Slika 4. Uloga NFκB u posredovanju upalne reakcije tijekom hipoksično-reoksigenacijskog oštećenja. Nastaje pozitivna povratna sprega između ROS, NF-κB i posrednika upale.

2.3.3. Antioksidansi

U stanici postoje mehanizmi koji ju štite od toksičkog djelovanja slobodnih kisikovih radikala. Više staničnih enzima (enzimski antioksidansi) pretvara slobodne kisikove radikale u manje toksične ili netoksične produkte i time smanjuje oksidativni stres (Halliwell, 1995.). Enzim superoksid dismutaza (SOD) pretvara superoksid u vodikov peroksid.

U fiziološkim uvjetima vodikov peroksid se odstranjuje reakcijom s reduciranim glutationom (GSH) pri čemu nastaju oksidirani glutation (GSSG) i voda. Tu reakciju katalizira enzim glutation peroksidaza. Za obnavljanje reduciranoga glutationa potreban je enzim glutation reduktaza. U razgradnji vodikova peroksida sudjeluje i katalaza koja pretvara vodikov peroksid u vodu i molekularni kisik. Ishemija i posljedična hipoenergoza smanjuju aktivnost ovih enzima (Krvavica i Gamulin, 2002.). Slobodni radikali kisika oštećuju stanične enzime pa tako i enzimske antioksidanse. U organizmu postoje i neenzimski zaštitni mehanizmi (ligandni »čistači«, engl. *scavenger*) kao što su vitamin A, vitamin E, vitamin C, albumin, mokraćna kiselina itd. U stanjima povećanog oksidativnog stresa, kao kod hipoksično-reoksigenacijskih oštećenja, ti mehanizmi nisu dostatni za očuvanje integriteta stanice.

Brojne egzogene tvari imaju svojstva antioksidansa. Tvari koje blokiraju enzimsku aktivnost, kao npr. alopurinol koji inhibira ksantin oksidazu te molekule koje vežu metalne ione, kao npr. desferioksamin koji veže željezo, mogu se svrstati u skupinu enzimskih antioksidansa. Neke druge egzogene tvari djeluju neenzimski, kao npr. manitol, N-acetilcistein. Neki lijekovi koji se primjenjuju u terapiji kardiovaskularnih bolesti, kao npr. inhibitori konvertaze angiotenzina i karvedilol imaju i antioksidantna svojstva (Book, 2002.).

Brojne studije pokušale su iskoristiti antioksidanse u svrhu sprječavanja ili modificiranja hipoksično-reoksigenacijskog oštećenja. Istraživanja enzima superoksid dismutaza (SOD), vitamina C, vitamina E, N-acetilcisteina (NAC, prekursor sinteze glutationa) in vitro i/ili na animalnim modelima upućuju na moguću korisnu ulogu ovih tvari u hipoksično-reoksigenacijskim oštećenjima (Warner i sur., 2004.; Cuzzocrea i sur., 2001.; Marczin i sur., 2003.). U nekim animalnim studijama hipoksično-reoksigenacijskog oštećenja bubrega pokazan je zaštitni učinak alopurinola, dok u drugim studijama primjena ovog antioksidansa nije bila učinkovita (nije spriječila promjene u sintezi bjelančevina, tj. raspad poliribosoma) (Ratych i Bulkley, 1986.; Paller, 1992.; Plestina i Gamulin, 2001.).

Epidemiološke studije upućuju na obrnuto proporcionalni odnos između unosa flavonoida (antioksidansa iz vina) i rizika od kardiovaskularnih bolesti (Cotelle, 2001.). Međutim, kliničke studije u kojima su antioksidansi primijenjeni u različitim stanjima koja karakterizira povećan oksidativni stres, uključujući i hipoksično-reoksigenacijsko oštećenje, kao i u slučaju pretkliničkih studija, nisu dale jednoznačne rezultate.

Problemi primjene antioksidansa u terapiji vezani su uz pitanja postizanja odgovarajuće koncentracije na mjestu djelovanja. Primjerice, primjena SOD je ograničena veličinom molekule (koja otežava ulazak u stanicu te prijelaz kroz krvno-moždanu barijeru), kratkim poluvijekom, kao i antigeničnošću nekih pripravaka (Warner i sur., 2004.; Cuzzocrea i sur., 2001.). Neki od ovih problema pokušavaju se riješiti uporabom malih molekula koje imaju aktivnost SOD (SOD mimetici) (Warner i sur., 2004.; Cuzzocrea i sur., 2001.). Uz to, neki antioksidansi, osim antioksidantnog djelovanja, mogu u određenim uvjetima imati i prooksidativne učinke (Pincemail, 1995.).

2.3.4. Uloga citokina u hipoksično-reoksigenacijskom oštećenju

Tijekom hipoksično-reoksigenacijskog oštećenja povećava se izražaj različitih upalotvornih i upalostatskih (proinflamatornih i antiinflamatornih) citokina. Upalotvorni citokini, kao što su TNFα i IL-1, sudjeluju u započinjanju i održavanju upalnog odgovora koji pridonosi hipoksično-reoksigenacijskom oštećenju (Streiter i sur., 1993.; Ferrari, 1999.). Povišenje razine TNFα uočeno je u tkivu različitih organa izloženih hipoksično-reoksigenacijskom oštećenju (bubreg, jetra, srce, mozak, pluća) i u serumu (Donnahoo i sur., 1999.). U slučaju hipoksično-reoksigenacijskog oštećenja jetre, porast plazmatske koncentracije TNFα i IL-1 uočen je već 5 minuta od početka reperfuzije (Serracino-Inglott i sur., 2001.). U bubrega je pokazano da glomerularne i tubularne epitelne stanice mogu, nakon ishemije praćene reperfuzijom, stvarati TNFα (Donahoo i sur., 1999.; Furuichi i sur., 2002.). TNFα i IL-1 potiču sintezu kemokina kao što su IL-8 i peptid koji aktivira neutrofile (ENA-78 od engl. *epithelial neutrophil activating peptide*). Oni imaju važnu ulogu pri kemotaksiji i aktivaciji neutrofila (Thornton i sur., 1990.; Chang i sur., 1994.). TNFα i IL-1 također potiču ekspresiju athezijskih molekula na epitelnim i endotelnim stanicama (Pober, 1988.). Zbog interakcije endotelnih stanica i leukocita dolazi do daljnjeg pojačanja stvaranja citokina.

Osim posredovanjem upalne reakcije, TNFα može i izravno oštetiti parenhim organa izloženih hipoksično-reoksigenacijskom oštećenju poticanjem apoptoze. Mehanizmi kojima TNFα potiče apoptozu detaljno su istraženi u slučaju miokarda, bubrega i jetre (Donnahoo i sur., 1999.; Meldrum, 1998.; Ding i Yin, 2004.). Osim lokalnih, TNFα i IL-1 imaju i brojne udaljene učinke.

Tako je TNFα uključen u posredovanje ozljede pluća povezane s ishemijom drugih organa. Nakon ishemije praćene reperfuzijom donjih ekstremiteta, kao i nakon hipoksično-reoksigenacijskog oštećenja crijeva raste razina TNFα u serumu što korelira s oštećenjem pluća. Prethodno davanje protutijela na TNFα ili proteina koji veže TNFα djelovalo je zaštitno u ovim eksperimentalnim modelima (Al-Mehdi i Fisher, 1998.).

Ova i brojna druga istraživanja upućuju na važnu ulogu TNFα u patogenezi akutnoga respiratornog distres sindroma (ARDS, engl. *acute respiratory distress syndrome*) (Bhatia i Moochhala, 2004.). Uz citokine u patofiziologiji ARDS-a važnu ulogu imaju i ROS i aktivirani neutrofili (Bhatia i Moochhala, 2004.; Chow i sur., 2003.).

TNFα i IL-1 posrednici su odgovora akutne faze u koju se uključuje akutni odgovor središnjega živčanog sustava i jetre, vrućica, katabolička reakcija, ubrzanje energijskog metabolizma i sekundarne promjene pojedinih funkcionalnih sustava (Kovač i Gamulin, 2002.a, b; Gabay i Kushner, 1999.). Stoga su važni u patogenezi sustavnog upalnog odgovora (SIRS – od engl. *systemic inflammatory response syndrome*) i višestrukog organskog zatajenja (MODS, engl. *multiple organ dysfunction syndrome*) (Kovač i Gamulin, 2002.a, b). Postupci kojima se pokušalo spriječiti djelovanje TNFα su inhibicija TNF transkripcije, odnosno inhibicija aktivnosti TNFα (Donnahoo i sur., 1999.). Anti TNF i topljivi TNF receptori istraživani su u stanju sepse bez očekivanog rezultata (Abraham i sur.,1995.). Mnogi autori naglašavaju pravodobno započinjanje anticitokinske terapije kao važnog čimbenika eventualnog uspjeha. U nekim situacijama povezanim s hipoksično-reoksigenacijskim oštećenjem, kao što je transplantacija ili djelomična resekcija organa (jetre, bubrega), angioplastika, te intraoperativno privremeno zaustavljanje arterijske cirkulacije, moguće je planirati vrijeme primjene terapije usmjerene protiv učinaka upalotvornih citokina (Donnahoo i sur., 1999.).

Tijekom hipoksično-reoksigenacijskog oštećenja povećava se i koncentracija upalostatskih citokina što je dio regulacijskih mehanizama tijekom upale. IL-10 je prototip upalostatskog citokina – inhibira sintezu TNFα i IL-1 i umanjuje (neutralizira) njihove upalotvorne učinke potičući izražaj njihovih antagonista – IL-1RA (od engl. *receptor antagonist*) i topljivog p75 TNF receptora. Primjena rekombinantnog mišjeg IL-10 smanjila je opseg oštećenja u eksperimentalnome modelu hipoksično-reoksigenacijskog oštećenja jetre (Yoshidome i sur., 1999.).

2.3.5. Uloga komplementa u hipoksično-reoksigenacijskom oštećenju

Aktivacija komplementa događa se u ranoj fazi (Zhou i sur., 2000.) hipoksično-reoksigenacijskog oštećenja. Sustav komplementa se sastoji od skupine bjelančevina koje djeluju kao posrednici humoralne imunosti. Komplement broji tridesetak membranskih i serumskih bjelančevina, a serumske se komponente normalno nalaze u inaktivnom obliku. Da bi se pokazao učinak komplementa, on mora biti aktiviran. Tijekom aktivacije komplementa iskazuju se različiti biološki učinci. Uloga komplementa u patogenezi hipoksično-reoksigenacijskog oštećenja pokazana je u više eksperimentalnih modela kao i u kliničkim situacijama u kojima hipoksično-reoksigenacijsko oštećenje ima važnu ulogu (Acosta i sur., 2004.). Aktivacija komplementa rani je događaj tijekom hipoksično-reoksigenacijskog oštećenja (Zhou i sur., 2000.). Hipoksija može aktivirati sve putove aktivacije komplementa: alternativni i klasični (Pemberton i sur., 1993.; Murohara i sur., 1995.), a preko citokeratina 1 i treći put aktivacije koji se zbiva preko lektina (Collard i sur., 2001.).

Aktivirane komponente komplementa mogu utjecati na funkciju drugih čimbenika uključenih u patofiziologiju hipoksično-reoksigenacijskog oštećenja: stvaranje ROS, aktivaciju neutrofila i stvaranje produkata aktiviranog endotela (Zhou i sur., 2000.; Acosta i sur., 2004.; Kilgore i sur., 1994.). Zhou i sur. istraživali su značenje pojedinih komponenta komplementa u eksperimentalnom modelu hipoksično-reoksigenacijskog oštećenja bubrega. Njihovi rezultati upućuju na ključnu ulogu litičkog kompleksa C5b-9 u oštećenju tkiva bubrega miša (Zhou i sur., 2000.). gdje dolazi do oštećenja parenhima bubrega.

U eksperimentalnim modelima hipoksično-reoksigenacijskog oštećenja korišteni su različiti inhibitori sustava komplementa. Rekombinantni sCR1 inhibira aktivaciju C3 komponente komplementa, inhibitor C1 (C1-INH) inhibira klasični put aktivacije komplementa. Antitijela protu-C5 blokiraju djelovanje C5a i formiranje litičkg kompleksa (Arumugam i sur., 1994.).

2.3.6. Uloga vazoaktivnih tvari u hipoksično-reoksigenacijskom oštećenju

U patogenezi hipoksično-reoksigenacijskog oštećenja važnu ulogu imaju vazoaktivni čimbenici (Serracino-Inglotti sur., 2001.; Grace, 1994.). Posebno su istraživani endotelin 1, kao najsnažnija vazokonstriktorna tvar, i dušični monoksid (NO) kao snažan vazodilatator. U ranim satima nakon infarkta miokarda zabilježeno je povišenje plazmatske koncentracije endotelina (Stewart i sur., 1991.). U eksperimentalnom modelu pokazano je da primjena antitijela na endotelin smanjuje veličinu infarkta miokarda (Watanabe i sur., 1991.). Međuodnos endotelina i NO detaljno je istražen u slučaju hipoksično-reoksigenacijskog oštećenja jetre. Koncentracija endotelina povećava se u plazmi i jetrenom parenhimu u ranoj fazi reperfuzije (Kawamura i sur., 1995.), dok je koncentracija NO niska u prvim satima reperfuzije jetre, što je posljedica niske unutarstanične koncentracije NADPH i kisika (kofaktora potrebnih za sintezu NO) i oslobađanja arginaze koja razgrađuje L-arginin (prekursor u sintezi NO) (Serracino-Inglott i sur., 2001.). Proizvodnja NO uspostavlja se tek više sati nakon početka reperfuzije. Proizvodnja NO je ovisna o indukciji inducibilnog oblika NO sintetaze (NOS) (Hur i sur., 1999.). Važnost međuodnosa ovih vazoaktivnih čimbenika u patofiziologiji hipoksično-reoksigenacijskog oštećenja jetre, potvrđena je i istraživanjima u kojima su primijenjena protutijela na endotelin 1 i endotelin 2 , odnosno antagonista receptora na endotelin. U tim je istraživanjima smanjen opseg hipoksično-reoksigenacijskog oštećenja, odnosno poboljšana je jetrena mikrocirkulacija (Scommotau i sur., 1999.). Primjena inhibitora NOS rezultirala je pogoršanjem parametara jetrene mikrocirkulacije u animalnim modelima hipoksično-reoksigenacijskog oštećenja (Koeppel i sur., 1997.). Ovi podatci upućuju na važnost međuodnosa endotelina i NO u patogenezi hipoksično-reoksigenacijskog oštećenja.

2.4. Presađivanje (transplantacija) organa

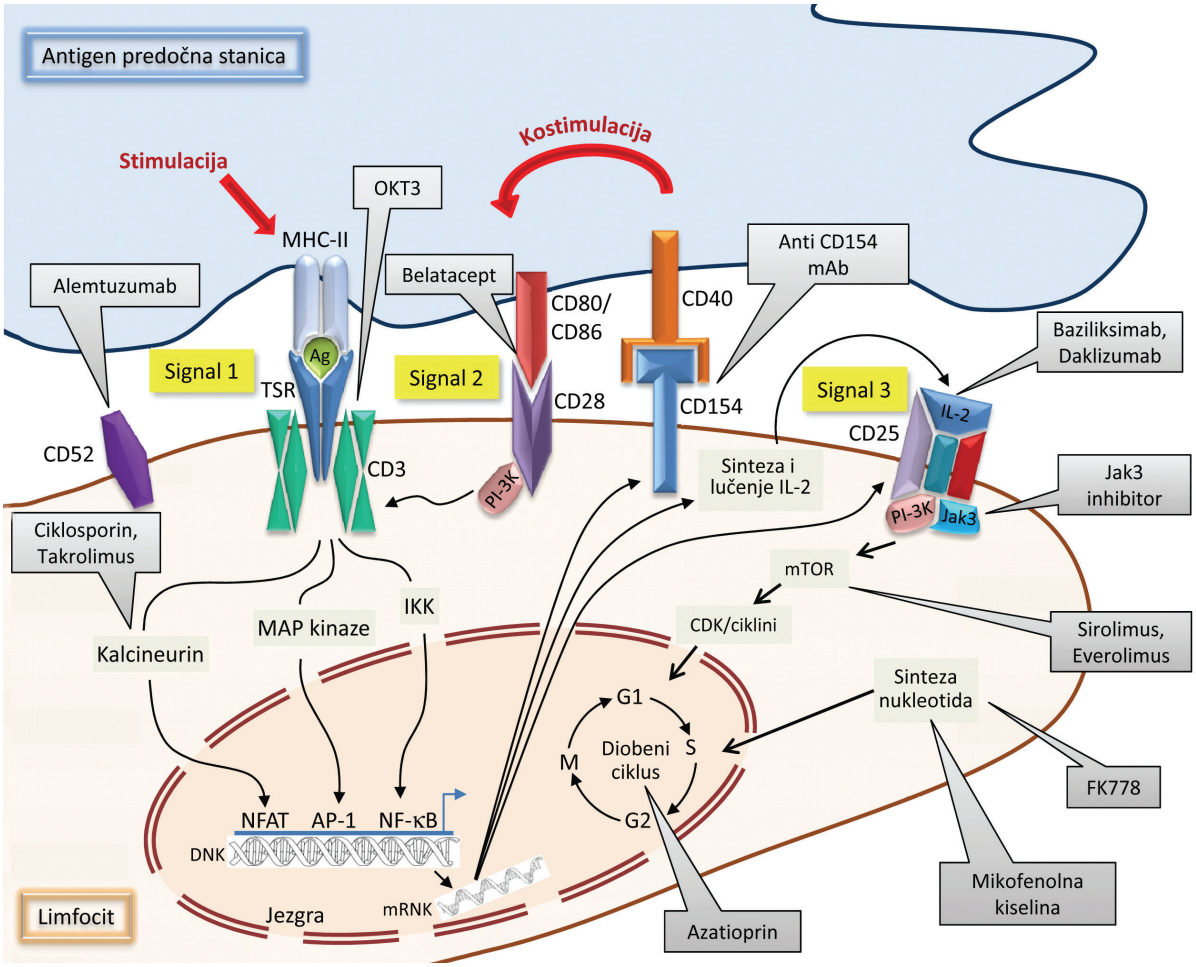
Presađivanje (transplantacija) organa danas je prihvaćen i uspješan način liječenja bolesnika, kod kojih je iz bilo kojih razloga došlo do nepovratnog zakazivanja funkcije pojedinog, za život potrebnog organa. U posljednjim desetljećima na taj se način mogu mnogi organi (bubreg, jetra, gušterača, pluća, tanko crijevo, stanice otočića gušterače, krvotvorne matične stanice) zamijeniti drugim, od drugog čovjeka - davatelja ili donora. Uspješno presađivanje organa godinama je usavršavano i ovisi o razvitku mnogih struka i stjecanju mnogih znanja - o razvoju kirurgije, reanimatologije, neurologije, urologije, imunologije, biokemije, nefrologije, hemodijalize, farmakologije, patologije.

U predtransplantacijskom probiru utvrđuje se krvna grupa i provodi HLA (engl. *Human Leukocyte Antigen*) tipizacija primatelja i davatelja te se utvrđuje preosjetljivost primatelja na antigene davatelja. HLA tipizacija je od najveće važnosti za transplantaciju bubrega i matičnih hematopoetskih stanica, dok je za transplantaciju srca, jetre, gušterače i pluća uloga HLA podudarnosti od manjeg značaja. HLA tipizacija limfocita periferne krvi ili limfnih čvorova koristi se za uspoređivanje najvažnijih poznatih determinanti tkivne podudarnosti davatelja i primatelja. Određuje se podudarnost u šest HLA antigena (HLA–A, –B, –C, –DP, –DQ, –DR). Podudarnost u što je moguće više HLA antigena značajno povećava preživljavanje bubrežnog transplantata. HLA podudarnost transplantata nesrodnih davatelja također povećava preživljavanje, iako u puno manjoj mjeri zbog brojnih još neutvrđenih razlika u tkivnoj podudarnosti. Novija imunosupresivna terapija je proširila mogućnosti transplantacije. HLA nepodudarnost nije više automatska prepreka za transplantaciju. HLA podudarnost kao i podudarnost u krvnim grupama (ABO) važne su za preživljavanje transplantata. Organi se mogu dobiti od živih i od mrtvih davatelja.

Organ potreban za život drugom čovjeku moguće je dobiti od umrle osobe nakon prestanka rada srca ili ranije, kod još kucajućeg srca osobe koja više nema moždane aktivnosti. Osnovni preduvjet za kasniju dobru funkciju ima onaj organ koji je do akta presađivanja imao urednu opskrbu kisikom, a to je upravo kod osoba koje su umrle zbog definitivnog oštećenja središnjeg živčanog sustava i koje kisik dobivaju pasivno, uz pomoć strojne podrške.

Transplantacija bubrega je najčešći oblik transplantacije solidnog organa. Bubreg davatelja se kirurškim putem uklanja iz tijela davatelja, propire hladnim otopinama koje sadrže relativno veliku koncentraciju slabo propusnih tvari (npr. manitol) i koncentraciju elektrolita sličnu unutarstaničnoj te se potom pohrani u ledenoj otopini. Na ovaj način se uglavnom uspješno očuva funkcija bubrega ukoliko se transplantira unutar 48 h. Prije transplantacije može biti potrebna dijaliza da bi se osigurao relativno normalan metabolički status. Nakon prijeoperativne pripreme pristupa se operativnom zahvatu – transplantaciji bubrega. Transplantirani bubreg se obično smješta u ilijačnu jamu. Krvne žile doniranog bubrega se anastomoziraju na zdjelične (ilijačne) krvne žile primatelja, a mokraćovod davatelja se implantira u mokraćni mjehur ili se (rjeđe) anastomozira na mokraćovod primatelja.

Budući da transplantirani bubreg predstavlja „strano“ tkivo, potrebito je provoditi terapiju protiv odbacijavna presatka. Tu terapiju nazivamo imunosupresija. Imunosupresivni lijekovi djeluju na različitim razinama aktivacije i proliferacije limfocita. Najčešće se primjenjuje kombinacija inhibitora kalcineurina, mikofenolat mofetila i kortikosteroida, uz indukcijsko imunosupresivno liječenje blokatorom IL-2 receptora ili antilimfocitnim globulinom. Zbog različitih mehanizama njihovih djelovanja (slika 5.) rutinski se primjenjuje kombinacija imunosupresivnih lijekova.



Slika 5. Mjesta djelovanja imunosupresivnih lijekova. Preuzeto iz Živčić-Ćosić i sur., 2010.
MHC: glavni sustav tkivne podudarnosti, prema engl. *major histocompatibility complex*;
TSR: T stanični receptor; Ag: antigen; mAb: monoklonsko protutijelo, prema engl. *monoclonal antibody*;
IL-2: interleukin-2;
PI-3K: fosfatidilinozitol-3 kinaza;
Jak: Janus kinaza;
MAP kinaze: mitogenom aktivirane protein kinaze;
IKK: inhibitor κB kinaza;
CDK: ciklin-ovisne kinaze, prema engl.*cyclin-dependent kinases*;
NFAT: jezgrin čimbenik aktiviranih limfocita-T, prema engl. *nuclear factor of activated T cells*;
AP-1: aktivacijska bjelančevina 1, prema engl. *activator protein-1*;
NF: jezgrin čimbenik, prema engl. *nuclear factor*

2.4.1. Primjena imunosupresivne terapije

Kortikosteroidi su bili prvi lijekovi za liječenje transplantacijske reakcije nakon presađivanja bubrega. Oni djeluju na specifičnu imunost blokirajući ekspresiju gena za citokine i citokinske receptore koji posreduju funkcije antigen predočnih stanica i limfocita-T, a pored toga svojim protuupalnim učincima djeluju i na nespecifičnu imunost. Zbog lipofilnosti kortikosteroidi lako difundiraju kroz stanične membrane te se vežu za citoplazmatske receptore povezane s bjelančevinama toplinskog šoka i proteinom koji veže tvar FK506 (takrolimus).

Ciklosporin i **takrolimus (FK506)** spadaju u skupinu imunosupresiva koji se nazivaju inhibitorima kalcineurina. Oni koče kalcineurinski put prijenosa signala u stanici. Na taj način smanjuju aktivaciju limfocita i proizvodnju citokina. Nakon vezivanja antigena za T stanični receptor, fosforilacija ZAP70 (engl. *zeta associated protein*) uzrokuje fosforilaciju fosfolipaze Cγ1, koja hidrolizira membranski fosfolipid fosfatidilinozitol 4,5 bifosfonat (PIP2) u inozitol 1,4,5-trifosfat (IP3) i diacilglicerol (DAG). IP3 dovodi do porasta koncentracije kalcija u stanici. Kalcij se veže za kalmodulin i tvori kompleks koji aktivira nekoliko enzima, uključujući fosfatazu kalcineurin.

Ciklosporin vezivanjem za citoplazmatski receptor ciklofilin i takrolimus vezivanjem za citoplazmatski receptor FKBP (engl. *FK binding protein*), koji kao i ciklofilin također pripada skupini imunofilina, tvore kompleks koji inhibira aktivnost kalcineurina. Time se smanjuje defosforilacija regulacijske bjelančevine NFAT (engl. *nuclear factor of activated T cells*) i onemogućava njezina translokacija u jezgru. Ometa se izražaj nekoliko citokinskih gena značajnih za aktivaciju limfocita-T, uključujući gene za IL-2, IL-4, IFN i TNF-α te gen za CD154 (CD40L), kao i izražaj protoonkogena H-ras i c-myc. Ciklosporin dodatno pojačava izražaj TGF-ß (engl. *transforming growth factor-ß*) koji dodatno inhibira lučenje IL-2 i novačenje citotoksičnih limfocita T. Postoji mogućnost da je TGF-ß odgovoran za razvoj intersticijske fibroze bubrega (nefrotoksično djelovanje inhibitora kalcineurina), a također se povezuje s pojačanim umnažanjem tumorskih stanica (Abramovicz i sur., 2005.; Lewis, 2004.; Janeway i sur., 2005.; Halloran, 2004.).

2.4.2. Anti-timocitni globulini

U uporabi su pripravci koji se dobivaju imunizacijom kunića ili konja humanim timocitima (timoglobulin) te imunizacijom kunića Jurkat staničnom linijom (ATG-F). Timoglobulin je pročišćen i pasteriziran gama-imunoglobulin dobiven imunizacijom kunića ljudskim timocitima. In vitro, timoglobulin (koncentracija > 0,1 mg/ml) posreduje T-stanične supresivne učinke kroz inhibiciju proliferacijskih odgovora na neke mitogene.

Navedeni pripravci sadrže citotoksična protutijela protiv velikog broja površinskih antigena T-limfocita, stanica NK i B-limfocita, adhezijskih molekula i kemokinskih receptora. Primarno djelovanje je posljedica deplecije T-limfocita ($CD3^+$ za više od 50 %) u krvi i limfnim organima, ali točan mehanizam nije poznat. Limfopenija se razvija unutar 24 sata i traje nekoliko godina, a $CD8^+$ T-limfociti oporavljaju se prije $CD4^+$ T-limfocita. Na jačinu deplecije T-limfocita u perifernim tkivima više utječe maksimalna razina lijeka nego ukupna kumulativna doza. Imunomodulacijskim djelovanjem ovi pripravci izazivaju i promjene u funkciji T-limfocita, potiču nastanak $CD4^+CD25Foxp3^+$ (Foxp3, engl. *forkhead box protein 3*) regulacijskih stanicaT, a mogu smanjiti staničnu infiltraciju kod reperfuzije organa i tijekom epizoda akutnog odbacivanja. Intraoperativna primjena prije reperfuzije može smanjiti učestalost odgođenog preuzimanja funkcije presatka (tubularne nekroze). Nije poznato može li oslobađanje citokina nakon infuzije pojačati reperfuzijsko oštećenje.

Uz konvencionalnu imunosupresivnu terapiju primjena anti-timocitnih globulina smanjuje učestalost akutnog odbacivanja presatka i omogućava odgođeno uvođenje inhibitora kalcineurina. Ovi preparati se primjenjuju osobito u bolesnika s velikim rizikom za odbacivanje ili povećanim rizikom za odgođeno preuzimanje funkcije presatka. Oni omogućuju smanjenje doze drugih imunosupresiva, liječenje s nižom dozom ili bez kortikosteroida te izrazito smanjenje doze inhibitora kalcineurina.

Poluvrijeme eliminacije anti-timocitnih globulina jako varira, a praćenje se temelji na određivanju broja T-limfocita u perifernoj krvi. Primijenjuju se razrjeđeni fiziološkom otopinom ili 5 %-tnom otopinom glukoze i vrlo sporo (tijekom nekoliko sati) infundiraju u veliku venu. Prije infuzije treba dati dnevnu dozu kortikosteroida, intravenski antihistaminik i antipiretik, jer tijekom primjene često dolazi do pojave sindroma otpuštanja citokina (Abramovicz i sur., 2005.; Lewis, 2004.; Janeway i sur., 2005.; Halloran, 2004.).

Konvencionalni imunosupresivni protokol, koji se danas koristi u većine bolesnika, obuhvaća inhibitor kalcineurina (takrolimus ili ciklosporin), mikofenolat mofetil (ili mikofenolnu kiselinu) i kortikosteroid. U ranom razdoblju nakon presađivanja, za suzbijanje reakcije odbacivanja, potrebita je jača imunosupresija te se koriste veće doze imunosupresivnih lijekova ili se dodaju indukcijski agensi – poliklonska ili monoklonska protutijela, čime se smanjuje učestalost akutnih reakcija odbacivanja. Uz navedene lijekove jednogodišnje preživljavanje bubrežnih presadaka iznosi više od 90 %, a učestalost akutnih reakcija odbacivanja do 15 % (Meier-Kriesche i sur., 2004.). Budući da pojedini lijekovi imaju različito mjesto djelovanja u imunosnom odgovoru, primjenjuje se istovremeno više različitih imunosupresivnih lijekova. K tome, neki lijekovi pokazuju aditivni ili sinergijski učinak, što omogućuje smanjenje doze, a time i štetno djelovanje. Indukcijsko imunosupresivno liječenje anti-timocitnim protutijelima potrebno je osobito u bolesnika s visokim rizikom za odbacivanje ili za odgođeno preuzimanje funkcije presatka. Nekoliko mjeseci ili godina nakon presađivanja dolazi do prilagodbe između primatelja i presatka pa je potrebno smanjiti dozu imunosupresivnih lijekova, ali lijekove i dalje treba uzimati svakodnevno i trajno. Zbog nesuradnje, nepravilnog uzimanja ili svojevoljnog ukidanja imunosupresivnih lijekova, u oko četvrtine bolesnika dolazi do pogoršanja ili gubitka funkcije presatka (Berthoux i sur., 2002.; Schweizer i sur., 2002.).

Liječenje treba prilagoditi potrebama bolesnika tako da postoji ravnoteža između učinkovitosti i podnošljivosti primijenjenih lijekova. Kod starijih primatelja bubrežnog presatka i bolesnika s poremećajem funkcije jetre, najčešće kao posljedica toksičnog učinka lijekova ili preboljenog hepatitisa, reakcije odbacivaja su rjeđe i slabijeg intenziteta, a veća je učestalost infekcija. Jaču imunosupresiju zahtijevaju primatelji s povećanim imunosnim rizikom koji mogu imati, primjerice, zbog manje HLA podudarnosti s darivateljem, senzibilizacije na tkivne antigene, ranijeg presađivanja organa, kombiniranog presađivanja

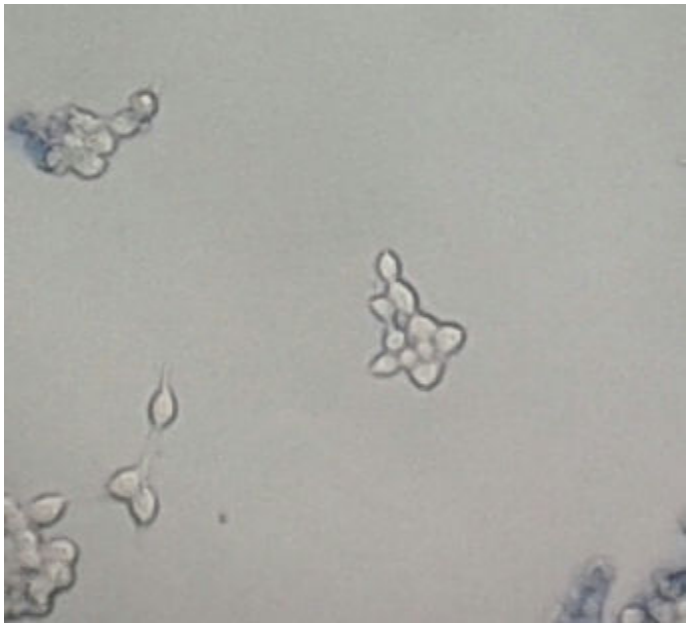
bubrega i gušterače, odgođenog preuzimanja funkcije presatka, mlađe životne dobi ili pripadnosti crnoj rasi. Da bi se smanjila učestalost i jačina neželjenih djelovanja ispituju se protokoli s novijim lijekovima te manjom dozom kortikosteroida ili inhibitora kalcineurina, njihovim ranijim ukidanjem ili potpunim izostavljanjem. Uvođenje novih imunosupresivnih lijekova i protokola otežava potreba za dugotrajnim praćenjem i liječenjem velikog broja ispitanika u kontroliranim kliničkim studijama, budući da je primjena modernih lijekova omogućila dugogodišnje preživljavanje presatka i bolesnika.

U nastupu akutne reakcije odbacivanja posredovane stanicama liječenje se započinje intravenskom primjenom pulsnih doza metilprednizolona tijekom tri do pet dana, uz provjeru, a prema potrebi i izmjenu doze drugih imunosupresivnih lijekova. Za liječenje kasnih reakcija odbacivanja koje se javljaju nakon trećeg mjeseca od presađivanja bubrega, preporučuju se pulsne doze kortikosteroida. U osnovi se većinom radi o "kroničnom odbacivanju" odnosno kroničnoj nefropatiji presatka koja prijeti daljnjim pogoršanjem ili gubitkom funkcije presatka. Nepotrebnim intenziviranjem imunosupresije može se izazvati dodatne komplikacije i pogoršati stanje bolesnika. (Abramovicz i sur., 2005.; Lewis, 2004.; Magee iSayegh, 2004.; Pham i sur., 2005.; EBPG Exspert Group on renal transplantation, 2000.). Nakon presađivanja bubrega može doći i do odgođene funkcije presatka (engl.*delayed graft function*). Radi se o obliku akutnog oštećenja bubrega, a manifestira se posttransplantacijskom oligurijom, povećava se imunogeničnost alografta i rizik od akutnog odbacivanja, te se dugoročno smanjuje preživljenje grafta. Na odgođenu funkciju grafta djeluju donorski čimbenici, kao i prerenalni, renalni i postrenalni čimbenici primatelja.

U eksperimentalnim studijama je viđeno da ponovna uspostava protoka krvi u hipoksijom oštećenom bubregu, nakon hipotermije aktivira složeni slijed događaja koji igraju ključnu ulogu u razvoju odgođene funkcije transplantata. Rasvjetljavanje patofiziologije bubrežne hipoksično-reoksigenacijskog oštećenja doprinjelo bi razvoju strategije za smanjenje stope odgođene funkcije transplantata.

2.5. Stanice HEK-293

Stanice HEK-293 su stanice koje izvorno potječu iz humanih embrijskih stanica bubrega uzgojenih u kulturi tkiva. Stanice HEK-293 se u laboratorijskim uvjetima (slika 6.) mogu lako umnažati i rasti, kao i transferirati. Zbog toga su te stanice podesne za istraživanje stanične biologije. Analizom je pokazano da je do transformacije došlo zbog ugradnje ~ 4,5 kilobaza virusnog genoma (adenovirusa) u ljudski kromosom 19. Činjenica da stanice potječu iz humanog embrijskog bubrega, ne govori mnogo o točnom staničnom podrijetlu stanica HEK- 293. Kultura stanica proizvedena iz embrijskog bubrega može sadržavati mali broj gotovo svih tipova stanica u tijelu, uključujući i stanice neuralnog grebena, neurona i glija stanica. Stanice HEK-293 imaju vrlo složen kariotip. Prisutnost više X kromosoma i nedostatak Y kromosoma ukazuju na to da je izvorna stanica bila iz embrija ženskog spola.



Slika 6. Stanice HEK-293 (iz lab. prof. Sinđić)

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Kultura stanica HEK-293

Divlji tip stanica HEK-293 je nasađen metodom tripsinizacije prema standardnom protokolu. Kad su pod svjetlosnim mikroskopom HEK-293 stanice dosegle konfluentnost od 80%, isprane su s 5 ml Hanksove otopine koja je sadržavala Mg^{2+} i Ca^{2+} (Sigma Aldricht Chemie GmbH) te nakon toga s 10 ml otopine bez Mg^{2+} i Ca^{2+}. Tijekom 1 minute primijenjen je 1 mL otopine sastava: 0,25% tripsina (Sigma Aldricht Chemie GmbH) i 0,02% EDTA (Sigma Aldricht Chemie GmbH) kako bi se stanice odvojile od podloge posude za staničnu kulturu. Odvojene stanice su skupljene te centrifugirane 4 minute na 1500 okretaja/min u mediju za prekid tripsinizacije (5 ml Hanksova otopina sa Mg^{2+} i Ca^{2+} u koju je dodano 2 ml 10%-tnog seruma goveđeg fetusa (Sigma Aldricht Chemie GmbH). Supernatant je bačen, a stanice su resuspendirane u 9 ml medija za održavanje -Eagle medij prilagođen po Dulbeccou (DMEM; Sigma Aldricht Chemie GmbH).

Stanice namijenjene mjerenju membranskih potencijala metodom prikovanih potencijala nasađene su na prethodno sterilizirana okrugla pokrovna stakalca. Za test grebanja i smrtnosti stanice u kulturi, one su nasađene direktno u Petrijeve posudice veličine 3 cm. Početna kultura stanica obilježena je kao P0, a svaka sljedeća obilježena je brojem koji označava broj izloženosti tripsinu (P1, P2, P3, itd.). HEK-293 stanice korištene su od 65 do 248 pasaže, a upotrebljavane u pokusima 3 - 10 (5,4 ±0,1 n=388) dana nakon nasađivanja. Stanice su održavane u DMEM mediju koji sadrži 3,7 g/l $NaHCO_3$, uz dodanih 2 mM L-glutamina (Sigma Aldricht Chemie GmbH), 10 ml/l Penicilin/Streptomicina (10000 E/10000 mg/ml; Sigma Aldricht Chemie GmbH) i 10% fetalnog goveđeg seruma u atmosferi s 5% CO_2/95% zraka na 37° C.

3.2. Imunocitokemija

Stanice HEK-293 nasađene na okrugla pokrovna stakalca veličine 1 cm inkubirana su 15 minuta na sobnoj temperaturi s 40 μg/mL timoglobulina (Novartis, Basel, Švicarska). Kontrolne stanice su bile u otopini bez timoglobulina. Stanice su fiksirane 5 minuta s otopinom acetona i metanola u omjeru 1:1 u Tris otopini (TBS, Sigma Aldricht) prethodno ohlađenim na -20° C. Zatim su osušene na zraku te isprane 2 puta po 5 min na sobnoj temperaturi otopinom TBS u koju je dodano 0,01% Tween 20. Nakon toga su inkubirane sa 1% mlijeka u prahu otopljenim u TBS-u u trajanju od 2 sata na sobnoj temperaturi. Potom su isprane 2 puta po 5 minuta otopinom TBS-a s dodatkom 0,01% Tween 20. Kao sekundarno protutijelo korišteno je ALEXA Fluor 546 anti kunićji IgG otopljen u TBS s dodatkom 0,5% albumina iz goveđeg seruma (BSA, Sigma Aldricht) u omjeru 1:50 i u trajanju od 1 sat na sobnoj temperaturi u mraku. Stanice su zatim isprane 3 puta po 5 minuta TBS-om na sobnoj temperaturi te uklopljene. Je li se timoglobulin vezao za stanice pokazano je na mikroskopu (Olympus AX70) snimljeno digitalnim fotoaparatom Canon EOS 400D, a rezultat uspoređen sa stanicama koje su inkubirane u otopini bez timoglobulina.

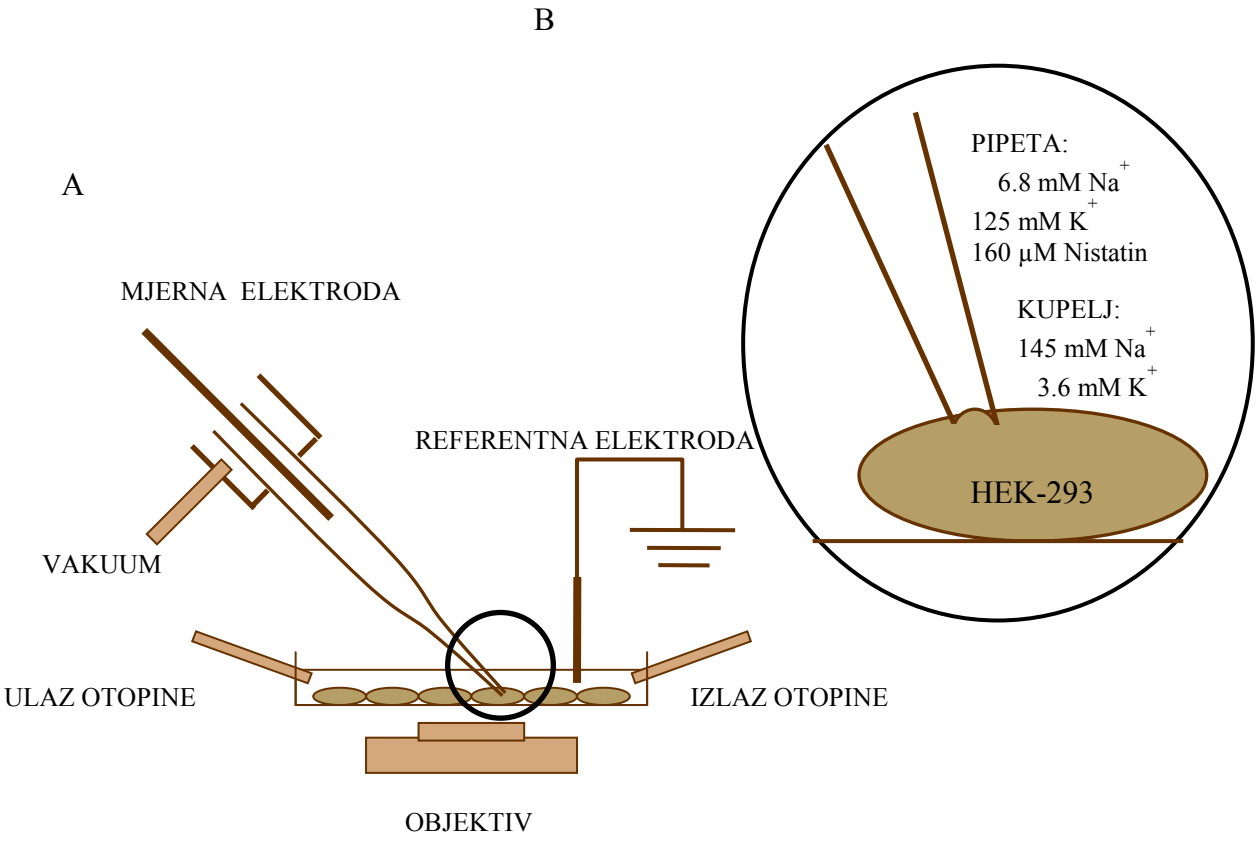
Da bismo ustvrdili površinsko vezanje timoglobulina, iste stanice su dalje inkubirane istim postupkom s primarnim protutijelom za površinsku molekulu za prianjanje (JAM-A, engl. *junctional adhesion molecule – A*) uz sekundarno ALEXA Fluor 488. Na kraju postupka stanice su inkubirane 5 min na sobnoj temperaturi s4′,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI 1:1000) bojom koja boji samo staničnu jezgru.

3.3. Metoda prikovanih potencijala

Stakalca s jednim slojem HEK-293 stanica fiksirana su na dno komorice za perfuziju smještenoj na invertnom mikroskopu (Axiovert 10, Zeiss, Gőttingen, Njemačka) (slika 7). Kao otopina za perfuziju u kojoj su bili otopljeni svi testirani pripravci, korištena je standardna Ringerova otopina koja je sadržavala: 145 mmol/L NaCl, 1,6 mmol/L K_2HPO_4, 0,4 mmol/L KH_2PO_4, 5 mmol/L D-glukoze, 1 mmol/L $MgCl_2$ i 1,3 mmol/L kalcij-glukonata (pH 7.4). Svi pokusi izvedeni su na 37° C uz brzinu perfuzije od 10 ml/min.

Membranski potencijali određeni su kao razlika između mjerne staklene elektrode (mjerna elektroda) te referentne elektrode umočene u otopinu koja oplakuje stanice. Obje elektrode sačinjene su od $AgCl_2$ tako da je pola sata prije izvođenja pokusa srebrna žica umočena u izbjeljivač što je dovelo do stvaranja površinskog sloja klora. Staklene pipete izgrađene izvlačenjem zagrijavanih staklenih cjevčica promjera 1,4 mm (Science products GmbH, Hofheim, Njemačka) uz pomoć Single Stage Glass Microelectrode Puller-a (PP 830, Narishige, Japan). Pipete korištene za pokuse ispunjene su otopinom koja je sadržavala: 95 mmol/L kalij- glukonata, 30 mmol/L KCl, 4,8 mmol/L Na_2HPO_4, 1,2 mmol/L NaH_2PO_4, 5 mmol/L D-glukoze, 0,73 mmol/L kalcij-glukonata, 1 mmol/L EGTA, 1,03 mmol/L $MgCl_2$ i 1 mmol/L ATP (pH 7,2) (slika 7.). Da bi se omogućio pristup unutrašnjosti stanice pod otvorom pipete, otopini je dodano 160 μM nistatina (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Njemačka). (Greger i Kunzelmann, 1991; Schlatter i Schafer, 1997.). Početni otpor ovako pripremljenih pipeta iznosio je između 2 i 10 MΩ (5,2 ±0,2 MΩ, n = 50).

Kada se stanica dodirne vrhom staklene pipete (slika 8.), primijeni se vakuum da bi se dio membrane uvukao u otvor pipete i pritom postiglo priljubljivanje membrane s posljedičnim stvaranjem megaomskog otpora. Nistatin u pipeti je nakon nekoliko minuta doveo do otvaranja nespecifičnih ionskih kanala, čime se električki povezala unutrašnjost stanice s mjernom elektrodom smještenom u staklenoj pipeti. Zbog posljedičnog polaganog porasta mjerenog potencijala do dosezanja stvarne vrijednosti, ova metoda se naziva “slow-whole-cell patch clamp technique”. Membranski potencijal mjeren je pomoću pojačala (U. Fröbe, Physiologisches Institut, Universität Freiburg, Germany) i bilježen pisačem (WeKa graph WK-250R, WKK, Kaltbrunn, Switzerland).



Slika 7. Metoda prikovanih potencijala. Stakalca sa jednim slojem HEK-293 stanica fiksirana su na dno komorice za perfuziju smještenoj na invertnom mikroskopu.
A: komorica za perfuziju smještena je na invertnom mikroskopu s otvorima za ulaz i izlaz otopine koja oplakuje stanice. U komoricu je smještena referentna elektroda dok se mjerna staklena elektroda prislanja na stanice.
B: uvećan prikaz mjerne elektrode u koju se uvlači dio stanične membrane te sadržaj natrija i kalija u otopini koja oplakuje stanicu (izvanstanična tekućina) te one koja se nalazi u mjernoj elektrodi (unutarstanična tekućina), a sadrži i nistatin koji omogućava pristup unutrašnjosti stanice.



Slika 8. Stanična kultura HEK-293 stanica prikazane u pokusu mjerenja membranskih potencijala. Lijevo je prikazana staklena mjerna elektroda koja dodiruje stanicu.

Pokusi su izvođeni kao parni, pri čemu je membranski potencijal dobiven za vrijeme oplakivanja stanica ispitivanom tvari, pod utjecajem inhibitora ili drugog hormona, uspoređivan s potencijalom prije i nakon učinka same tvari. Učinak svih korištenih tvari na membranski potencijal (V_m) izračunavan je prema formuli:

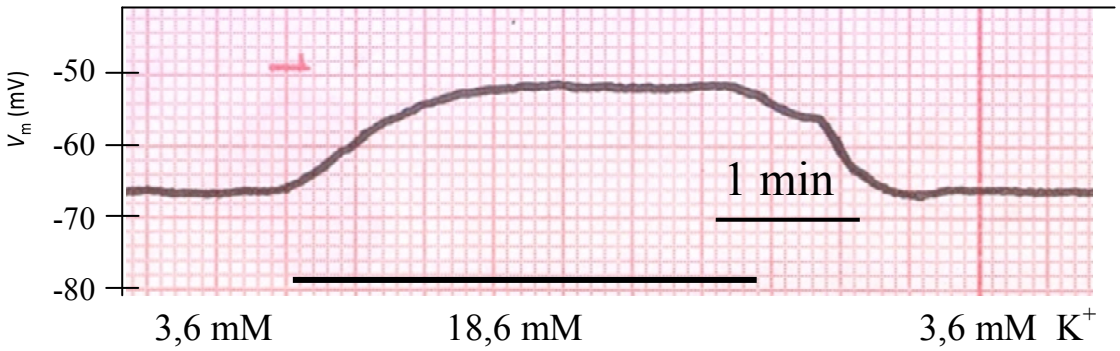
$$\Delta V_m\,(mV) = V2 - \frac{V1 + V3}{2}$$

V_1 = membranski potencijal stanice prije učinka ispitivane tvari

V_2 = membranski potencijal stanice za vrijeme učinka

V_3 = membranski potencijal stanice nakon učinka

Nakon uspostavljanja stabilnog membranskog potencijala, vijabilnost stanice određivana je promjenom koncentracije kalija u otopini sa 3,6 na 18,6 mM. Originalni zapis te izračunavanje učinka prikazan je na slici 9. Depolarizacijski učinak porasta koncentracije kalija je zatim izračunat po gore navedenoj formuli i iznosi 15 mV gdje je V1 iznosi -67 mV, V2 iznosi -52 mV te se membranski potencijal vraća na početnu vrijednost od -67 mV (V3).



Slika 9. Originalni zapis promjene membranskog potencijala V_m (mV) na primjeru depolarizacije u iznosu od 15 mV na HEK-293 stanicama izazvane porastom koncentracije K^+ u kupelji s 3,6 mM na 18,6 mM.

Timoglobulin (25 mg) je otopljen u otopini vode i glicerola (1:1) u volumenu od 5 mL. U pokusima je korišteno 2, 4, 8 i 16 µL/mL ove otopine što daje koncentraciju timoglobulina od 10, 20, 40 i 80 µg/mL. Da bi se uklonio mogući učinak glicerola i vode, kontrola je bio isti volumen otopine glicerola i vode bez timoglobulina.

3.4. Hipoksično-reoksigenacijsko oštećenje HEK-293 stanica

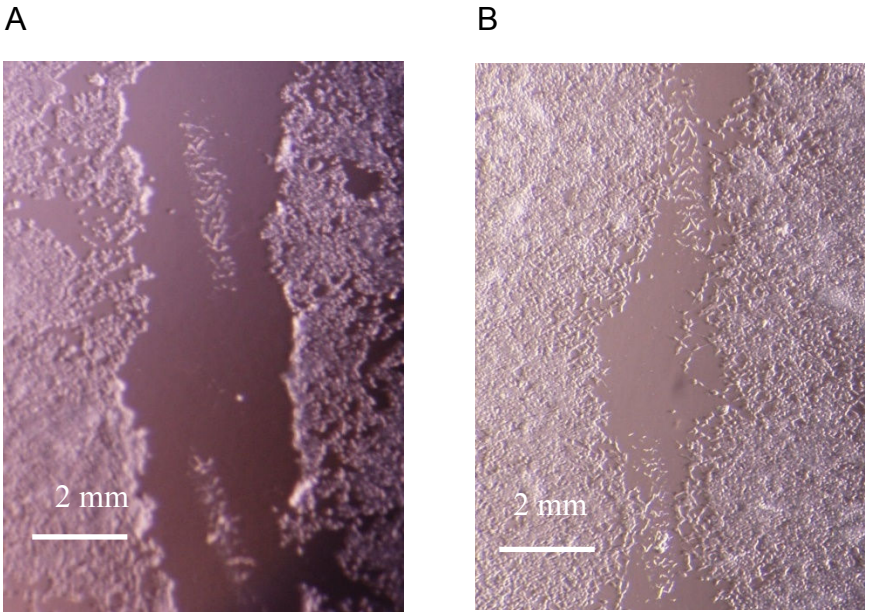
Da bismo pokazali učinak timoglobulina u hipoksično-reoksigenacijskim uvjetima, HEK-293 stanice su inkubirane timoglobulinom 24 sata na 37° C u atmosferi 5% CO_2-95% N_2 nakon čega je slijedila oksigenacija stanica inkubacijom sat vremena na 37° C u atmosferi 5% CO_2-95% zraka. Stanice su držane u DMEM mediju koji sadrži 3,7 g/L $NaHCO_3$, uz dodanih 2 mM L-glutamina te 10 ml/L Penicilin/Streptomicina (10000 E/10000 mg/ml) uz dodatak 20, 40 ili 80 μg/mL timoglobulina otopljenog u otopini glicerola i vode u omjeru 1:1 s komplementom (razrijeđenim 1:200, Sigma Aldrich) ili bez njega. Pokazano je da samo otapalo mijenja membranski potencijal i zato je u ovim pokusima morala biti korištena adekvatna kontrolna otopina glicerola i vode bez timoglobulina. Uspoređivane su HEK-293 stanice koje su bile u hipoksijskim uvjetima u odnosu na one koje nisu. Učinci timoglobulina na hipoksično-reoksigenacijsku ozljedu su promatrani u odnosu na smrtnost i migraciju HEK-293 stanica.

3.4.1. Određivanje smrtnosti HEK-293 stanica

Smrtnost HEK-293 stanica određivana je tripanskim modrilom (Tripan blue 0,4% Sigma Sigma Aldrich) koje ne ulazi u zdrave i žive stanice. Kada su stanice oštećene ili mrtve, tripansko modrilo ulazi u stanicu i boji ju. Brojanjem obojenih stanica u odnosu na neobojene dobiva se postotak mrtvih stanica u kulturi. Stanicama, koje smo izvadili iz hipoksične komore i kontrolnim stanicama koje nisu bile izložene hipoksijskim uvjetima, pažljivo smo odstranili medij, dodali 10% tripansko modrilo u fiziološkoj otopini, te inkubirali stanice nekoliko minuta na sobnoj temperaturi. Tripansko modrilo isprali smo fiziološkom otopinom i stanice izbrojili na svjetlosnom mikroskopu.

3.4.2. Test grebanja

HEK-293 stanice konfluentnosti od 70% su zagrebene po površini vrhom pipete (slika 10.) te odvojene u dvije zasebne skupine od kojih je jedna stavljena u hipoksičnu komoru. Druga kontrolna skupina, bila je izložena kisiku u normalnim uvjetima stanične kulture u DMEM mediju koji sadrži 3,7 g/L $NaHCO_3$, uz dodanih 2 mM L-glutamina te 10 ml/L Penicilin/Streptomicina (10000 E/10000 mg/ml) i dodatak 20, 40 ili 80 μg/mL timoglobulina s komplementom (razrijeđenim 1:200, Sigma Aldrich) ili bez njega. Kontrola su bile stanice kojima je dodan jednak volumen otopine u kojoj je otopljen timoglobulin i/ili komplement kao što je opisano ranije. Nakon inkubacije u trajanju od 24 sata određen je razmak između stanica pod stereomikroskopom (Olympus SZX10). Na slici 10. prikazano je smanjenje udaljenosti između stanica nakon 24 sata od održavanja stanice u normoksijskim uvjetima na 37° C.



Slika 10. Test grebanja. Smanjenje udaljenosti između HEK-293 stanica nakon 24 sata kada su stanice održavane u normoksijskim uvjetima na 37 ^{o}C. A: kultura stanica odmah nakon što je njihova površina zagrebana, B: kultura stanica pod A nakon 24 sata u uvjetima normalne količine kisika pokazuju smanjenje razmaka između stanica radi njihove migracije

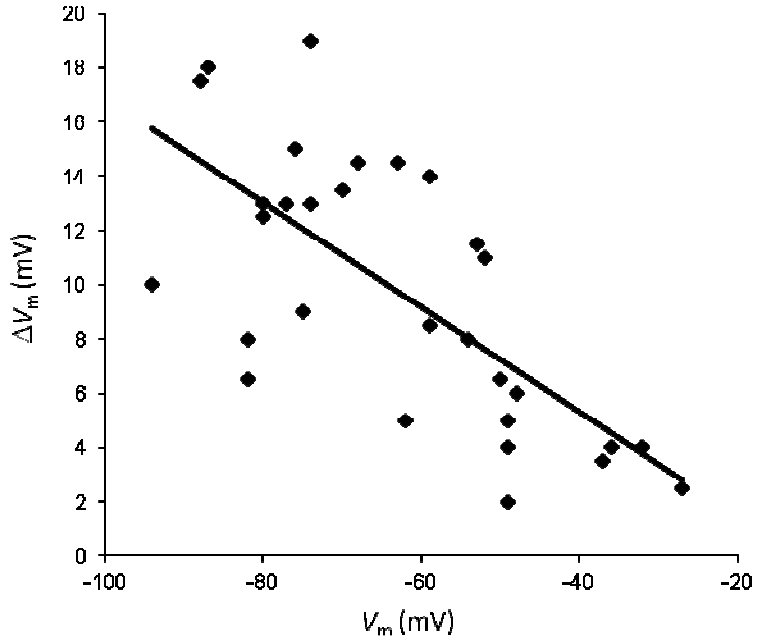
4.5. Statistička obrada rezultata

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. Za statističku obradu podataka korišten je Studentov t test (zavisni i nezavisni ovisno o potrebi, pri čemu je svaki učinak uspoređivan sa svojom kontrolom). Kod uspoređivanja više od dva parametra korišten je ANOVA statistički test s posthoc Tukey-testom. Statistička značajnost definirana je na razini p vrijednosti manjoj od 0,05. Odnose između ispitivanih vrijednosti određena je izračunom r vrijednosti testovima korelacije. Analiza je provedena koristeći računalni program GrafPad Software.

4. REZULTATI

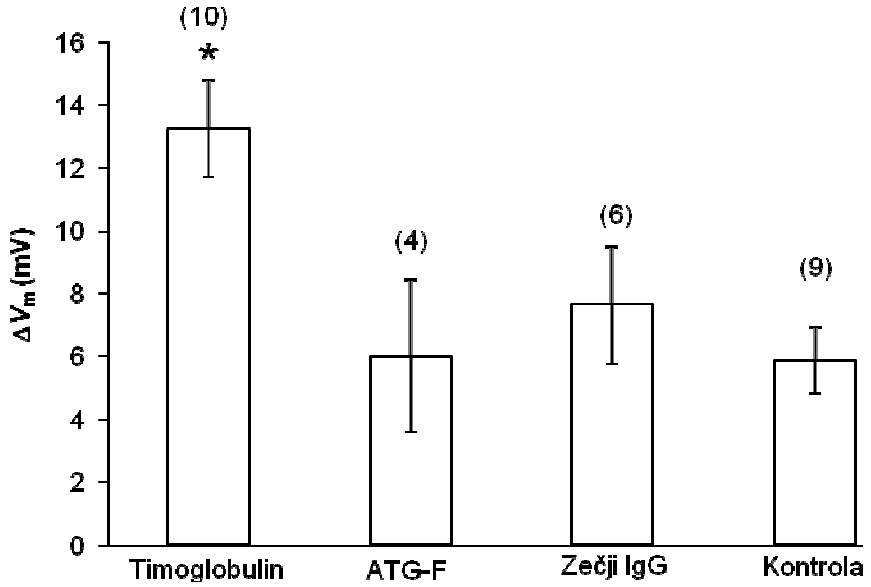
4.1. Učinak timoglobulina na promjenu membranskog potencijala HEK-293 stanica

HEK-293 **s**tanice su korištene od 65. do 119. pasaže (86,6 ± 3,3 pasaža, n = 50) i to 4 do 10 dana nakon pasažiranja (6,5 ± 0,3 dana, n=50). Početni membranski potencijal HEK-293 stanica iznosio je -51,7 ± 3,3 mV (n = 50). Početni otpor mjerne pipete iznosio je 2-10 (5,2 ± 0,2) MΩ (n = 50). Da bismo testirali vijabilnost stanica prije pokusa, koristili smo depolarizacijski odgovor stanica na porast koncentracije K^+ za 15 mM (originalni zapis na slici 9) koji je iznosio ΔV_m = 10,1 ± 0,9 mV, n = 31. Ovaj odgovor stanica stavili smo u odnos s početnim membranskim potencijalom koji su u negativnoj korelaciji. Što je početni potencijal negativniji, to je i depolarizacijski učinak hiperkalijemije viši (slika 11, r = -0,54).



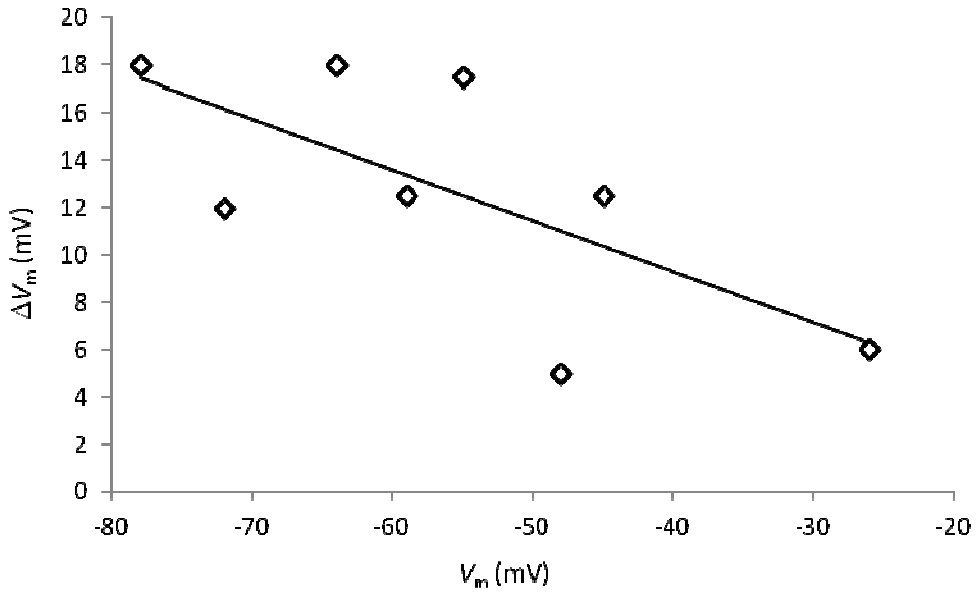
Slika 11. Odnos početnog membranskog potencijala (V_m) i promjene membranskog potencijala (ΔV_m) uzrokovanog porastom izvanstanične koncentracije K^+ u otopini s 3,6 na 18,6 mM (r = -0,54).

Na početku istraživanja odredili smo koji od preparata imunoglobulina, od onih koji se koriste u transplantacijskoj medicini, imaju učinak na HEK-293 stanice. Od tri skupine korištenih preparata (timoglobulin, ATG-F te zečji IgG (40 μg/mL)) jedino je timoglobulin statistički značajnije jače depolarizirao staničnu membranu u odnosu na kontrolu (slika 12.) (glicerol/voda 50%/50% - otopina u kojoj su bila otopljena protutijela).



Slika 12. Depolarizacijski učinak timoglobulina, ATG-F-a te zečjeg IgG na membranski potencijal HEK-293 stanica. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. Broj pokusa je prikazan u zagradama. * označava statističku značajnost na razini $p<0,05$ u odnosu na kontrolnu skupinu

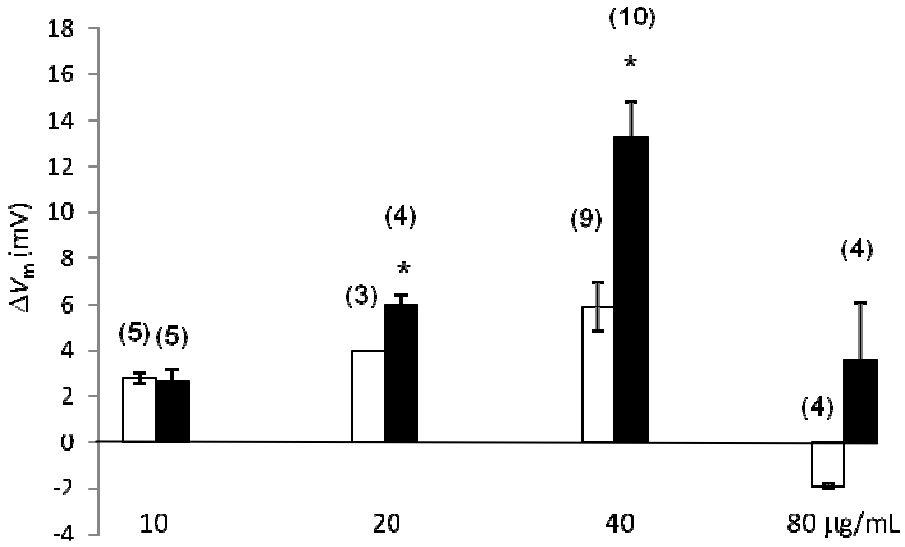
Kao što smo već pokazali za odgovor stanica na hiperkalijemiju, tako smo ponovno stavili u odnos početni membranski potencijal i depolarizacijski učinak timoglobulina. Učinak timoglobulina je viši ako je i početni membranski potencijal viši (slika 13.).



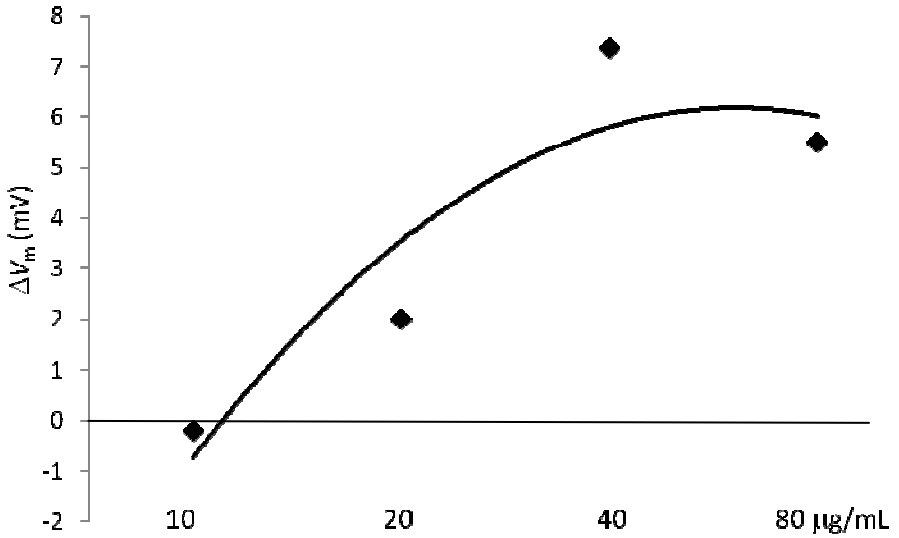
Slika 13. Odnos početnog membranskog potencijala (V_m) i promjene membranskog potencijala (ΔV_m) uzrokovanog timoglobulinom (40 μg/mL) na stanicama HEK-293 (r = -0,69).

S obzirom na to da je vodljivost stanične membrane osjetljiva na većinu danas poznatih otapala, prilikom izvođenja pokusa morali smo iznimno paziti da kontrolne skupine imaju uvijek jednaku količinu otapala kao i pokusna skupina. Učinak na membranski potencijal potvrdili smo i na koncentracijski ovisnoj krivulji odgovora (slika 14A). Kako je i otapalo imalo svoj učinak na membranski potencijal, na slici 14B su prikazane razlike u učinku kontrolne i pokusne skupine. Timoglobulin doseže svoj maksimalan učinak pri koncentraciji od 40 μg/mL. Početni membranski potencijali kod pojedine skupine nisu se statistički razlikovali.

A



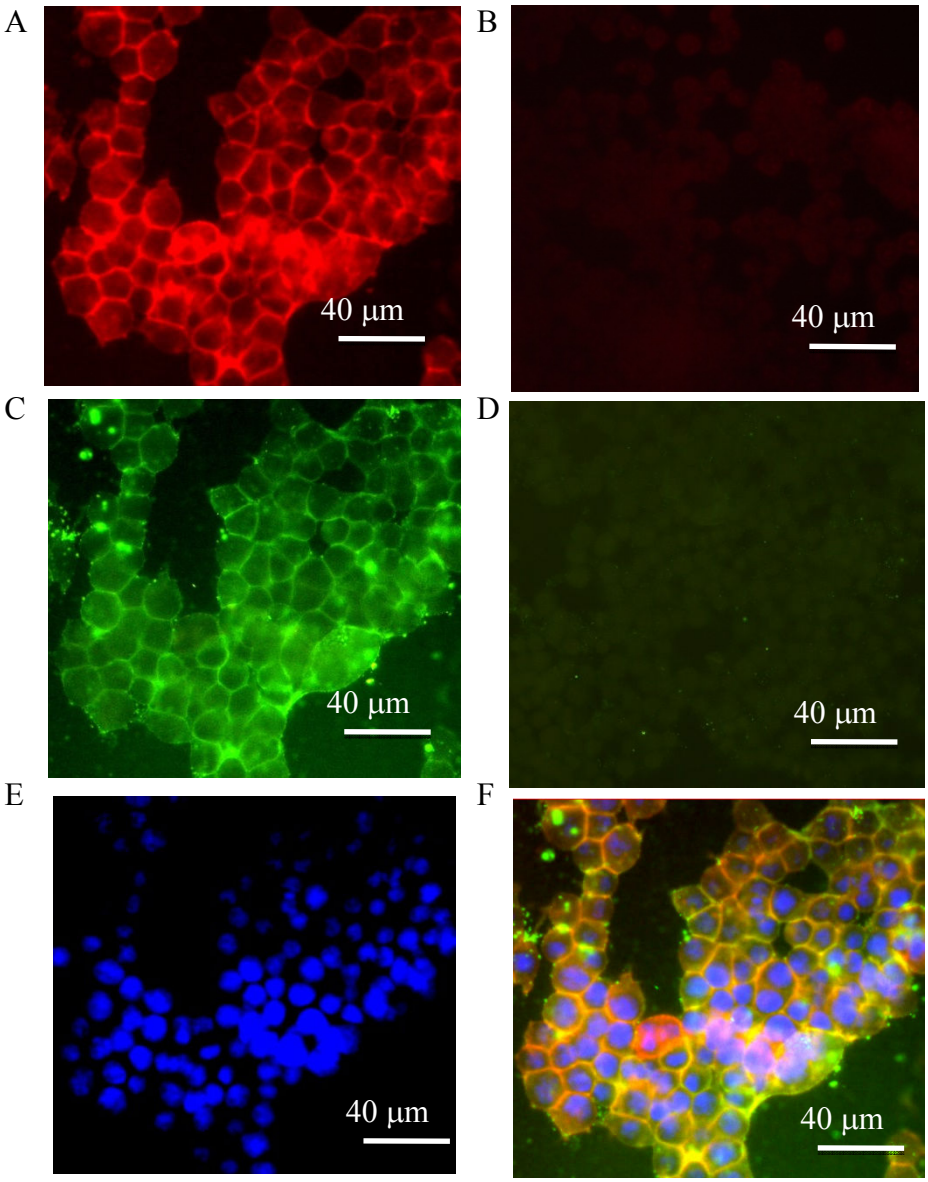
B



Slika 14. Depolarizacijski učinak timoglobulina ovisan o koncentraciji. A: Depolarizacijski učinak timoglobulina ovisan o koncentraciji (crni stupci) u odnosu na pripadajuću kontrolu (bijeli stupci). B: Razlika u depolarizaciji membrane HEK-293 stanica pod djelovanje timoglobulina i pripadajuće kontrole. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. Broj pokusa je prikazan u zagradama. * označava statističku značajnost na razini $p<0,05$ u odnosu na kontrolnu skupinu

4.2. Vezanje timoglobulina na stanice HEK-293

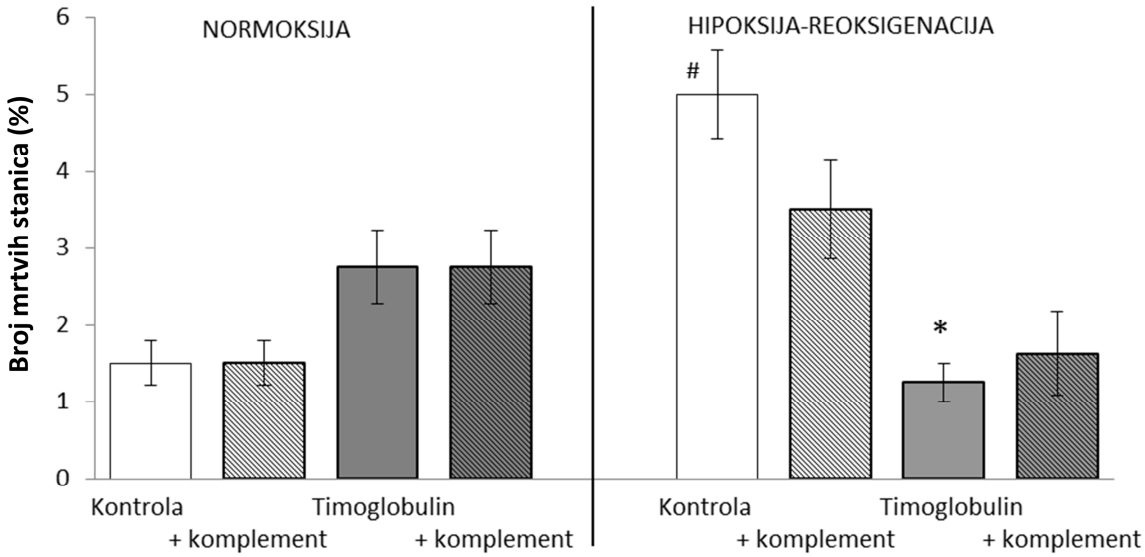
Da bi neka tvar mogla djelovati na membranski potencijal, mora mijenjati vodljivost membrane za ione. To je moguće vezanjem na staničnu površinu na neki od proteinskih receptora (posljedična aktivacija sustava drugih glasnika) ili direktnim djelovanjem na ionske kanale. Da bismo pokazali smještaj timoglobulina na površini stanice, pokazali smo njegovu kolokalizaciju s površinskom molekulom za prianjanje (JAM-A, engl. *junctional adhesion molecule – A*) prikazano na slici 15.



Slika 15. Vezivanje timoglobulina na površinu HEK-293 stanica. A: timoglobulin; B: negativna kontrola; C: površinska molekula za prianjanje (JAM-A, engl. *junctional adhesion molecule – A*); D: negativna kontrola; E: plavo obojene jezgre stanica (DAPI); F: spoj A, C i E koja pokazuje preklapanje timoglobulina i površinske JAM-A molekule (prikazano žutom bojom)

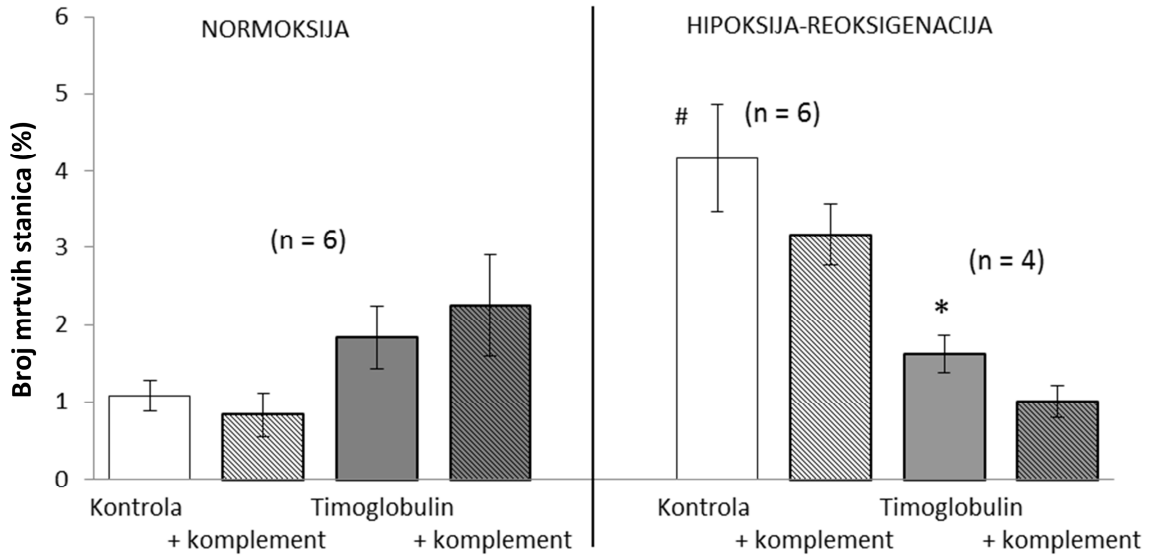
4.3. Učinak timoglobulina u normoksičnim uvjetima te nakon hipoksično-reoksigenacijskog oštećenja na smrtnost HEK-293 stanica

Do sada smo pokazali da se timoglobulin veže za površinu HEK-293 stanica i da dovodi do promjene membranskog potencijala. Nadalje smo htjeli utvrdili hoće li timoglobulin svojim direktnim djelovanjem na HEK-293 stanice dovesti do smanjenja njihove smrtnosti u hipoksično-reoksigenacijskim uvjetima.



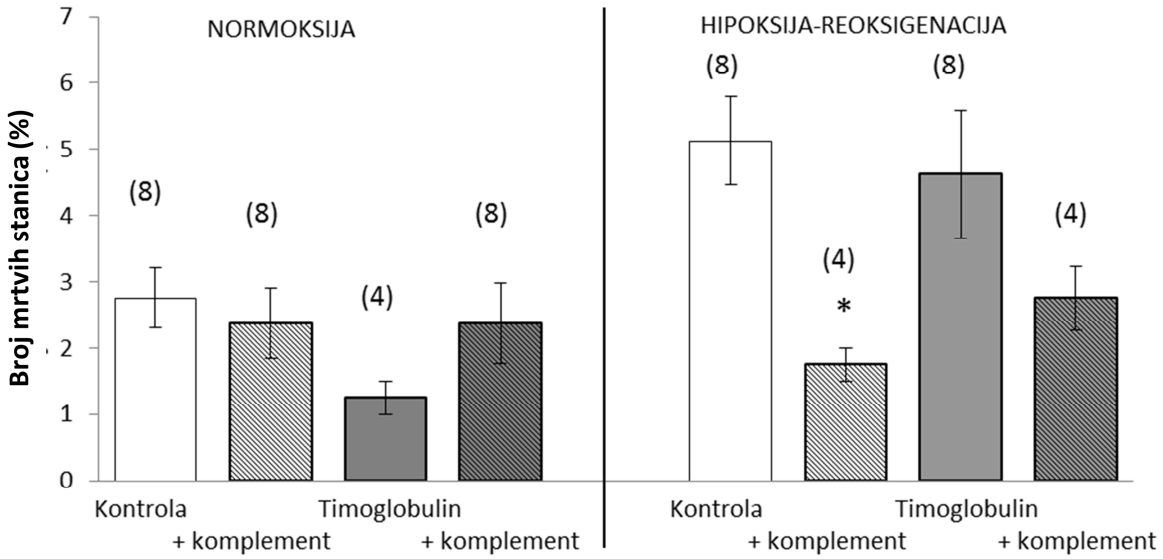
Slika 16. Timoglobulin 20 μg/mL smanjuje smrtnost HEK-293 stanica u hipoksijskim uvjetima. U normoksijskim uvjetima timoglobulin nije imao statistički značajan učinak na smrtnost stanica. Hipoksijsko-reoksigenacijsko oštećenje prikazano je porastom smrtnosti kontrolnih stanica, a inkubacija stanica s 20 μg/mL timoglobulina tijekom hipoksije dovela je do statistički značajnijeg smanjenja smrtnosti stanica u odnosu na kontrolne stanice u hipoksijskim uvjetima. Dodatak komplementa nije doveo do značajne razlike u smrtnosti stanica ni u normoksijskim ni u hipoksijskim uvjetima. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. Broj pokusa je n = 4. # - označava statistički značajnu razliku na razini $p<0,05$ u odnosu na kontrolne vrijednosti u normoksijskim uvjetima, * označava statističku značajnost na razini $p<0,05$ u odnosu na kontrolnu skupinu u hipoksijskim uvjetima

Da bismo pokazali učinak timoglobulina u hipoksično-reoksigenacijskim uvjetima, HEK-293 stanice su inkubirane timoglobulinom 24 sata u atmosferi 5% CO_2-95% N_2 nakon čega je slijedila faza reoksigenacije stanica sat vremena u atmosferi 5% CO_2-95% zraka. Timoglobulin je bio otopljen u glicerolu i vodi (1:1) s komplementom ili bez njega. Koncentracije korištene u ovom dijelu istraživanja su one koje dovode do depolarizacije HEK-293 stanica (20, 40, 80 μg/mL). Kontrolne stanice su inkubirane otopinom glicerola i vode u istoj količini samo bez timoglobulina da bi se izbjegao mogući učinak otapala. Uspoređivane su stanice koje su bile u hipoksijskim uvjetima u odnosu na one koje nisu. Smrtnost stanica određivana je bojanjem tripanskim plavilom.



Slika 17. Timoglobulin 40 μg/mL smanjuje smrtnost HEK-293 stanica u hipoksijskim uvjetima. U normoksijskim uvjetima timoglobulin (sivi stupci) nije imao statistički značajan učinak na smrtnost stanica. Hipoksijsko-reoksigenacijsko oštećenje prikazano je porastom smrtnosti kontrolnih stanica dok je inkubacija stanica s 40 μg/mL timoglobulina tijekom hipoksije dovela do statistički značajnijeg smanjenja smrtnosti stanica u odnosu na kontrolne stanice (bijeli stupci) u hipoksijskim uvjetima. Komplement nije doveo do značajne razlike u smrtnosti stanica ni u normoksijskim ni u hipoksijskim uvjetima (isprugani stupci). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. Broj pokusa je prikazan u zagradama. # - označava statistički značajnu razliku na razini $p<0,05$ u odnosu na kontrolne vrijednosti u normoksijskim uvjetima, * označava statističku značajnost na razini $p<0,05$ u odnosu na kontrolnu skupinu u hipoksijskim uvjetima.

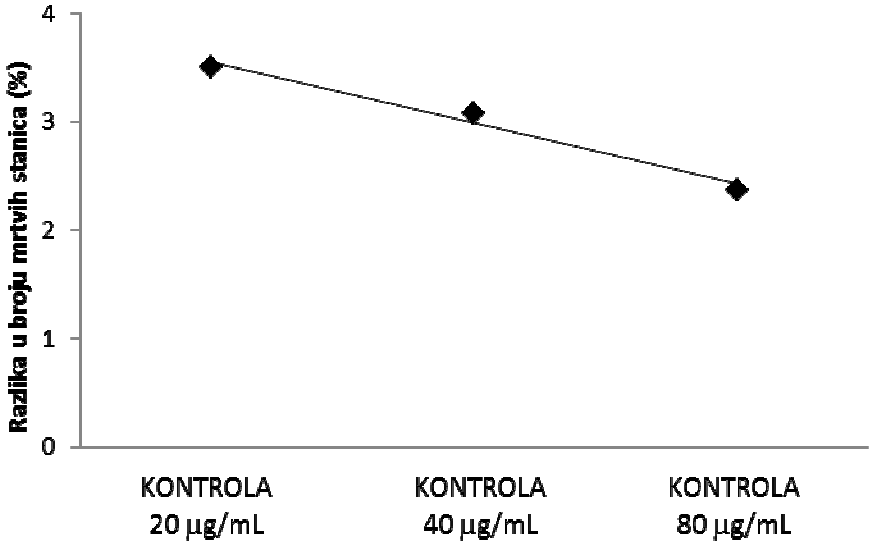
U normoksijskim uvjetima timoglobulin nije imao statistički značajan učinak na smrtnost stanica. Hipoksijsko-reoksigenacijsko oštećenje prikazano je porastom smrtnosti kontrolnih stanica dok je inkubacija stanica sa 20 i 40 μg/mL timoglobulina tijekom hipoksije dovela do statistički značajnijeg smanjenja smrtnosti stanica u odnosu na kontrolne stanice u hipoksijskim uvjetima (slika 16. i 17.). Ovaj učinak nije primijećen pri koncentraciji timoglobulina od 80 μg/mL (slika 18. i 19.). Osim u jednom pokusu, komplement nije doveo do značajne razlike u smrtnosti stanica ni u normoksijskim ni u hipoksijskim uvjetima (slika 18.).



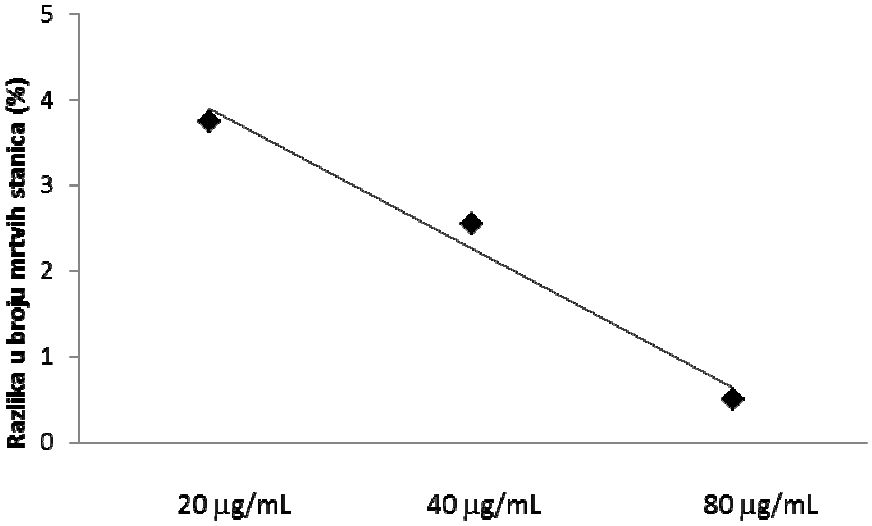
Slika 18. Timoglobulin 80 μg/mL ne smanjuje smrtnost HEK-293 stanica u hipoksijskim uvjetima. U normoksijskim uvjetima timoglobulin (sivi stupci) nije imao statistički značajan učinak na smrtnost stanica. Inkubacija stanica s 80 μg/mL timoglobulina tijekom hipoksije nije bila statistički značajna u odnosu na kontrolne stanice (bijeli stupci) u hipoksijskim uvjetima. Jedino je u kontrolnim stanicama u hipoksijskim uvjetima komplement doveo do statistički značajnog smanjenja smrtnosti (isprugani stupci). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. Broj pokusa je prikazan u zagradama. # - označava statistički značajnu razliku na razini $p<0,05$ u odnosu na kontrolne vrijednosti u normoksijskim uvjetima, * označava statističku značajnost na razini $p<0,05$ u odnosu na kontrolnu skupinu u hipoksijskim uvjetima

Da bismo pokazali da učinak timoglobulina na smrtnost stanica u hipoksijsko-reoksigenacijskim uvjetima ovisi o koncentraciji, oduzeli smo postotak smrtnosti stanica koje su inkubirane samo otapalom te smrtnost stanica inkubiranih timoglobulinom (slika 19). Kako smo već pokazali proučavajući učinak na promjenu membranskog potencijala, samo otapalo je pokazalo učinak i na smrtnost stanica time što se postotak smrtnosti, nastao djelovanjem hipoksijsko-reoksigenacijskih uvjeta, smanjuje s povećanjem koncentracije glicerola u staničnom mediju kontrolnih stanica (slika 19).

A



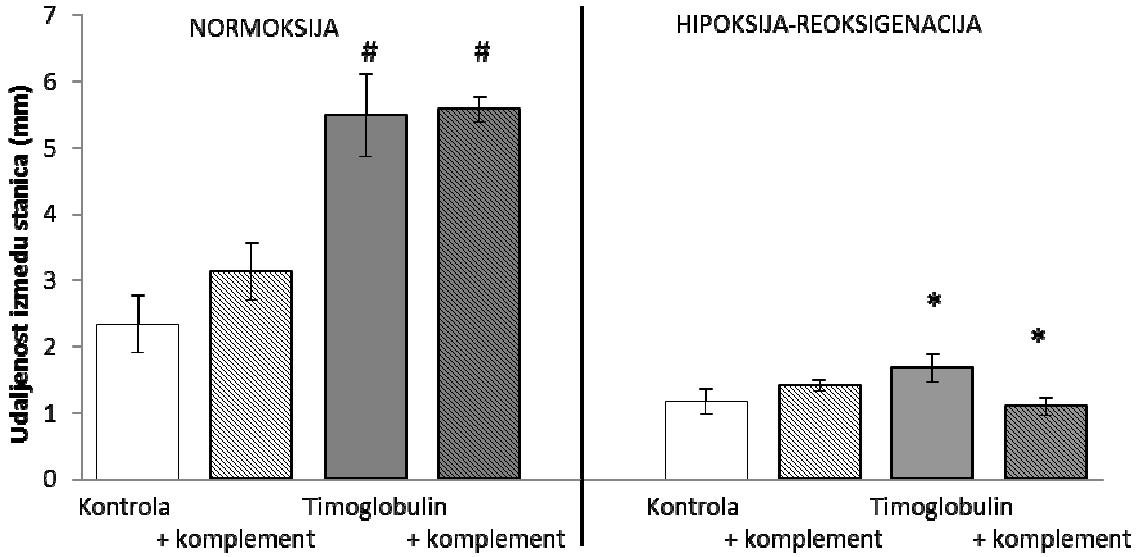
B



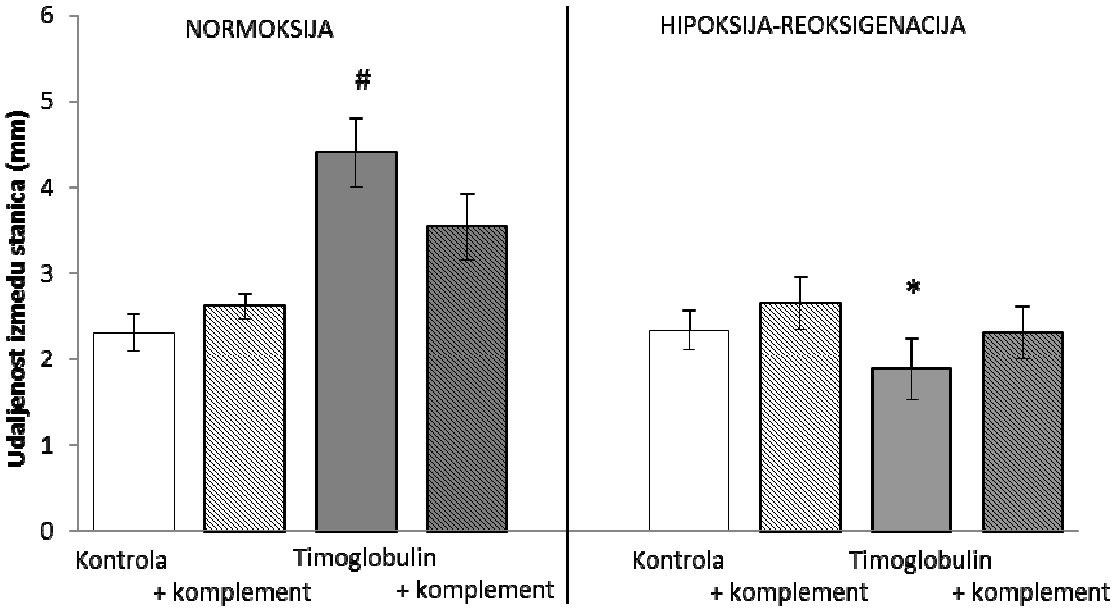
Slika 19. Učinak timoglobulina na smrtnost HEK-293 stanica u hipoksijsko-reoksigenacijskim uvjetima. A: U hipoksijsko-reoksigenacijskim uvjetima u odnosu na normoksiju stanice će imati najveću povećanu smrtnost u kontrolnoj skupini (otapalo) od 20 μg/mL, a najmanju u kontrolnoj skupini od 80 μg/mL. Crta prikazuje trend smanjenja razlike u broju mrtvih stanica ovisno o koncentraciji. B: Razlika u djelovanju timoglobulina i pripadajuće kontrole na smrtnost stanica u hioksijsko-reoksigenacijskim uvjetima ovisno o koncentraciji. Timoglobulin pokazuje najveći učinak pri najmanjoj koncentraciji te njegov učinak prestaje pri koncentraciji od 80 μg/mL. Linija prikazuje trend smanjenja razlike u broju mrtvih stanica ovisno o koncentraciji.

4.4. Učinak timoglobulina u normoksičnim uvjetima te nakon hipoksično-reoksigenacijskog oštećenja na migraciju HEK-293 stanica

Do sada smo pokazali učinak timoglobulina na membranski potencijal HEK-293 stanica te na smanjenje smrtnosti istih u hipoksijsko-reoksigenacijskim uvjetima. U ovom dijelu rada željeli smo odrediti povećava li timoglobulin migraciju stanica te time omogućava brži oporavak, ili smanjuje njihovu migraciju te štedi energiju i resurse za preživljavanje stanica u lošim uvjetima. Migraciju stanica istraživali smo testom grebanja. Ukratko, stanice su zagrebane po površini te odvojene u dvije zasebne skupine od kojih je jedna stavljena u hipoksičnu komoru, dok je druga kontrolna skupina bila izložena kisiku u normalnim uvjetima stanične kulture. Stanicama je dodano 20, 40 ili 80 μg/mL timoglobulina sa komplementom ili bez njega. Kontrolnim je stanicama dodan jednak volumen otopine u kojoj je otopljen timoglobulin i/ili komplement kao što je opisano ranije.



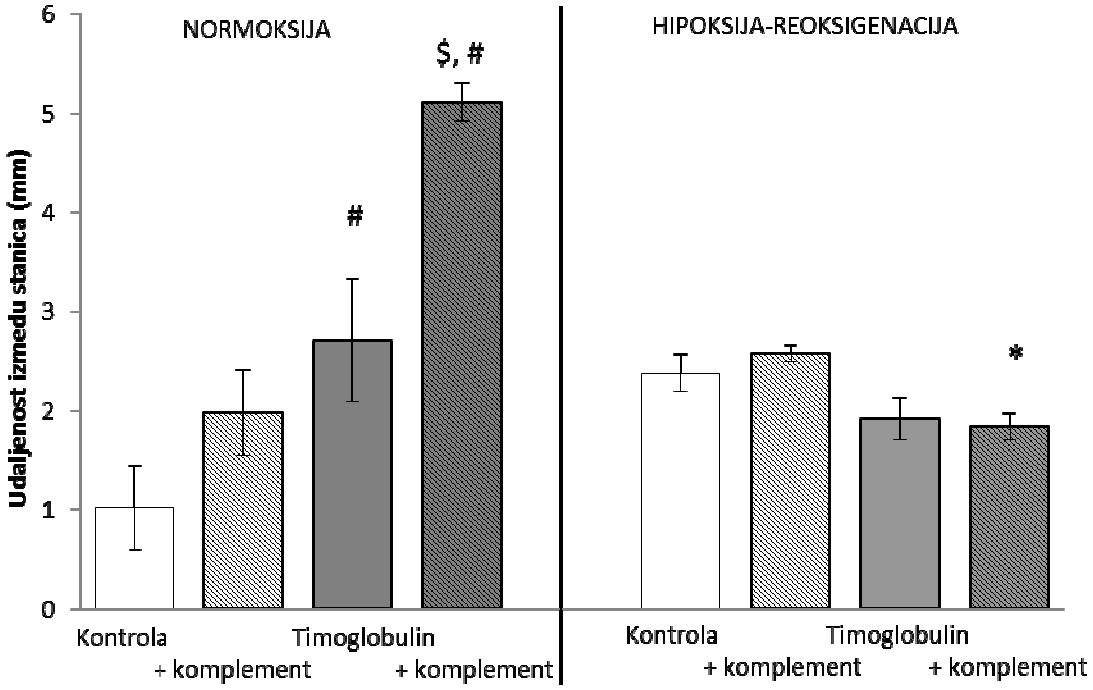
Slika 20. Timoglobulin 20 μg/mL smanjuje udaljenost između HEK-293 stanica u hipoksijsko-reoksigenacijskim uvjetima u odnosu na normoksijske uvjete. U normoksijskim uvjetima timoglobulin statistički značajno povećava razmak između stanica 24 sata nakon testa grebanja. U hipoksijsko-reoksigenacijsko uvjetima taj porast razmaka ne nastaje. Komplement nije doveo do značajne razlike u udaljenosti između stanica ni u normoksijskim ni u hipoksijskim uvjetima. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. Broj pokusa je n = 4. # - označava statistički značajnu razliku na razini $p<0,05$ u odnosu na kontrolne vrijednosti (i za pokuse sa i za pokuse bez komplementa), * označava statističku značajnost na razini $p<0,05$ u odnosu na timoglobulin u normoksijskim uvjetima (i za pokuse sa komplementom i za pokuse bez njega).



Slika 21. Timoglobulin 40 μg/mL smanjuje udaljenost između HEK-293 stanica u hipoksijsko-reoksigenacijskim uvjetima u odnosu na normoksijske uvjete. U normoksijskim uvjetima timoglobulin statistički značajno povećava razmak između stanica 24 sata nakon testa grebanja. U hipoksijsko-reoksigenacijsko uvjetima taj porast razmaka ne nastaje. Komplement nije doveo do značajne razlike u udaljenosti između stanica ni u normoksijskim ni u hipoksijskim uvjetima. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. Broj pokusa je n = 4. # - označava statistički značajnu razliku na razini $p<0,05$ u odnosu na kontrolne vrijednosti (vrijedi za pokuse bez komplementa), * označava statističku značajnost na razini $p<0,05$ u odnosu na timoglobulin u normoksijskim uvjetima (vrijedi za pokuse bez komplementa).

U normoksijskim uvjetima 24 sata nakon početka testa timoglobulin je doveo do porasta razmaka između stanica. U hipoksijsko-reoksigenacijskim uvjetima razmak između stanica nije statistički značajno različit u odnosu na kontrolu (slika 20. i 21.).

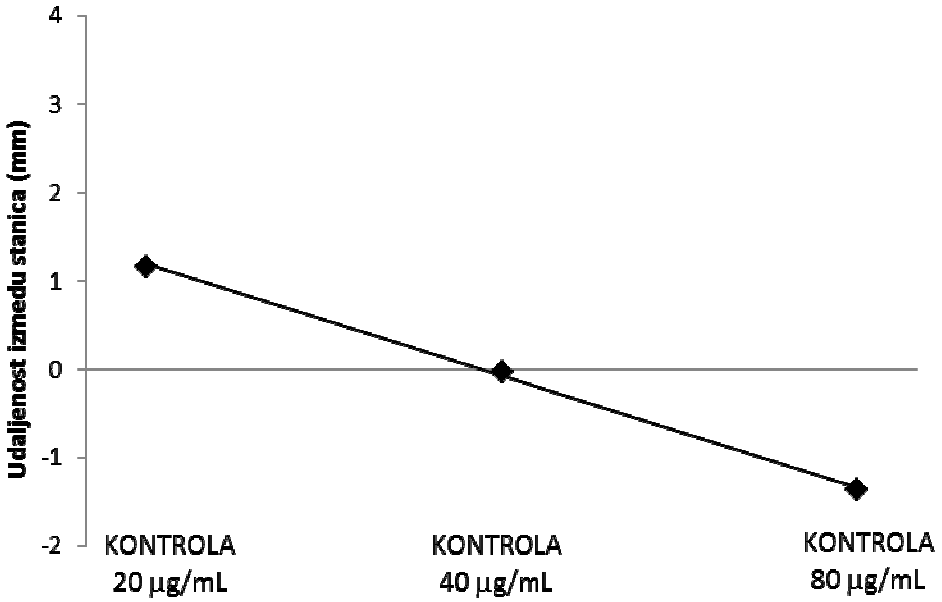
U pokusima pri koncentraciji od 80 μg/mL (slika 22 i 23.) timoglobulin je također imao učinka na razmak između stanica u normoksijskim uvjetima koji je dodatkom postao još značajniji iskazujući porast smrtnosti stanica uzrokovanih komplementom.



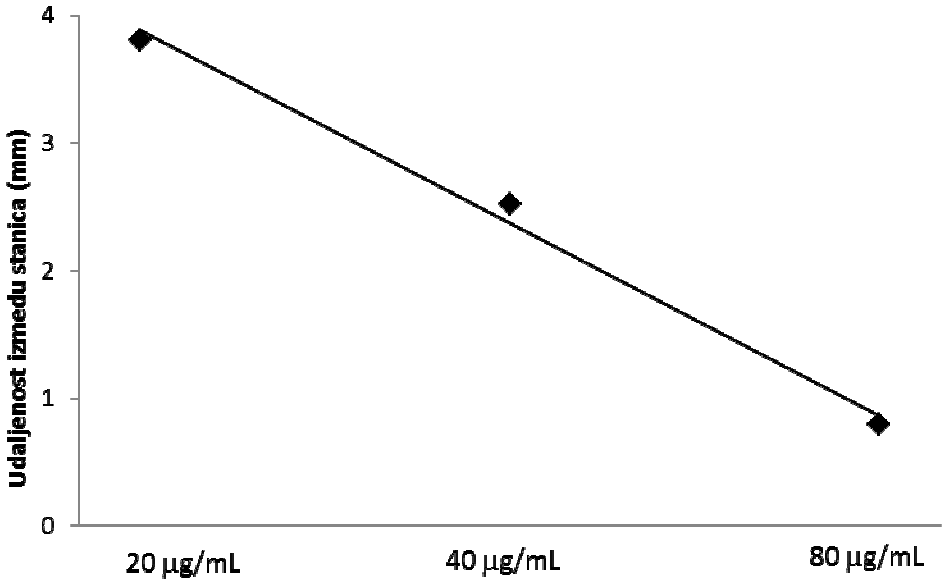
Slika 22. Timoglobulin pri koncentraciji od 80 μg/mL nema učinak na udaljenost između HEK-293 stanica u hipoksijsko-reoksigenacijskim uvjetima u odnosu na normoksijske uvjete. U normoksijskim uvjetima timoglobulin statistički značajno povećava razmak između stanica 24 sata nakon testa grebanja što je dodatno potaknuto dodavanjem komplementa. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. Broj pokusa je n = 4. # - označava statistički značajnu razliku na razini $p<0,05$ u odnosu na kontrolne vrijednosti (i za pokuse sa i za pokuse bez komplementa), $ označava statističku značajnost na razini $p<0,05$ u odnosu na timoglobulin u normoksijskim uvjetima bez komplementa.* označava statističku značajnost na razini $p<0,05$ u odnosu na timoglobulin u normoksijskim uvjetima.

Budući da otapalo ponovno ima učinak i na ovaj dio istraživanja, pokazali smo učinak kontrole na razliku razmaka između stanica u normoksijskim u odnosu na hiposkijsko-reoksigenacijske uvjete (slika 23.). Pri nižim koncentracijama otapalo smanjuje razmak između stanica, tj. nema učinka na migraciju, dok je pri najvećoj koncentraciji razmak između stanica povećan što upućuje na dodatno štetno djelovanje kontrolnog otapala na migracije u hipoksijsko-reoksigenacijskim uvjetima.

A



B



Slika 23. Učinak timoglobulina u testu grebanja u hipoksijsko-reoskigenacijskim uvjetima. A: U hipoksijsko-reoskigenacijskim uvjetima u odnosu na normoksiju udaljenost između HEK-293 stanica kontrolnoj skupini od 20 μg/mL će se smanjiti, a povećati u kontrolnoj skupini od 80 μg/mL. Linija prikazuje trend smanjenja razlike u udaljenost između stanica ovisno o koncentraciji. B: Razlika u djelovanju timoglobulina i pripadajuće kontrole na udaljenost između stanica u hipoksijsko-reoksigenacijskim uvjetima ovisno o koncentraciji. Timoglobulin pokazuje najveće smanjenje razmaka između stanica u hiposkijsko-reoksigenacijskim uvjetima u odnosu na normoksijske pri najmanjoj koncentraciji te njegov učinak prestaje pri koncentraciji od 80 μg/mL. Linija prikazuje trend smanjenja razlike u udaljenost između stanica ovisno o koncentraciji.

5. RASPRAVA

Zbog spoznaje da se timoglobulin veže na veliki raspon antigena i koristi se u pacijenata nakon transplantacije bubrega, postavili smo hipotezu da se timoglobulin može vezati direktno za ljudske embrionalne stanice bubrega (HEK-293) te smanjiti veličinu oštećenja i smrtnost stanica direktnim djelovanjem tijekom nastanka hipoksijsko-reoksigenacijskog oštećenja.

5.1. Učinak otapala (glicerola) na membranski potencijal te smrtnost i migraciju HEK-293 stanica tijekom hipoksično-reoksigenacijskog oštećenja

Do sada je poznato da i otapala koja se koriste u istraživanjima mogu imati protektivni učinak (Kelava i sur., 2010.; Ye i sur., 2006.). Posebna se pažnja treba obratiti upravo primjeni kontrolnih otopina u istraživanjima, a to se nažalost još i danas rijetko čini. Timoglobulin je, kao protutijelo, otopljen 1:1 otopini glicerola i vode s time da koncentracije timoglobulina od 10, 20, 40, 80 μg/mL odgovaraju 1, 2, 4, te 8 μL/mL glicerola. Nasuprot mogućoj zaštitnoj ulozi glicerola, pokazano je da i glicerol izaziva akutno renalno zatajenje. Djelovanjem na bubrežne krvne žile može dovesti do bubrežne ishemije (Westenfelder i sur., 1980.; Hobbs i sur., 1976.).

Vodljivost stanične membrane osjetljiva na većinu danas poznatih otapala, kao na primjer dimetil sulfoksid (DMSO), depolarizira staničnu inhibicijom kalijskih kanala (Phan i sur., 2002.). Koliko je nama poznato, do danas nitko nije odredio promjene membranskog potencijala uzrokovanog glicerolom. Pri porastu koncentracije glicerola od 1, 2 i 4 μL/mL glicerol sve jače depolarizira staničnu membranu. Pri najvišoj koncentraciji glicerola od 8 μL/mL dovodi do obrnutog odgovora tj. hiperpolarizacije membrane, djelujući ili na drugu vrstu ionskih kanala ili mijenjajući učinak na istu vrstu ionskih kanala. Ovi rezultati pokazuju da i sam glicerol kao otapalo za timoglobuline ima učinak na HEK-293 stanice te smo u našem radu u narednim pokusima morali testirati učinak glicerola i na smrtnost i na migraciju stanica u hipoksijsko-reoksigenacijskim uvjetima.

Smrtnost je bila najveća pri najnižoj koncentraciji glicerola od 2 μL/mL (kontrolna skupina za timoglobulin od 20 μg/mL) te je iznosila 3,5%. S porastom koncentracije glicerola na 4 μL/mL smrtnost se smanjila na 3,1% a pri najvišoj koncentraciji na 2,4% što daje smanjenje smrtnosti upotrebom glicerola od 1,1% te ukazuje na njegovo zaštitno djelovanje (slika 19.A). Pri testu grebanja, glicerol je pri najnižoj koncentraciji potaknuo migraciju stanica dok je pri najvišoj koncentraciji smanjio migraciju stanica u hipoksijsko-reogsigenacijskim uvjetima (slika 23.A). Ovaj obrnuti učinak pokazan je djelovanjem glicerola na membranski potencijal stanica (slika 14.).

5.2. Učinak timoglobulina na promjenu membranskog potencijala HEK-293 stanica

Dosad smo pokazali da otapalo (glicerol) posjeduje svoja fiziološka svojstva. U daljnjem istraživanju posebnu smo pažnju posvetili adekvatnom odabiru kontrolnih skupina tj. da kontrolne skupine imaju uvijek jednaku količinu otapala kao i pokusna skupina.

Timoglobulin je u ovom radu depolarizirao staničnu membranu HEK-293 stanica, i to ovisno o koncentraciji (najveći učinak je zamijećen pri koncentraciji od 40 μg/mL), za razliku od ATG-Fa koji nije imao učinak, tj. bio je jednak onima u kontrolnim skupinama. Ovaj rezultat je sukladan rezultatima dosadašnjih studija u kojima je pokazano da timoglobulin ima izraženiji učinak na akutno odbacivanje bubrega u odnosu na ATG-F (Yokota N i sur.,2002.).

Pokazali smo da se timoglobulin nalazi na površini stanične membrane HEK-293 stanica jer kolokalizira s površinskom JAM-A molekulom. Da bi doveo do promjene membranskog potencijala, timoglobulin mora mijenjati vodljivost membrane za ion. To je moguće na dva načina:

1. vezanjem za specifičan receptor smješten na površini stanice te posljedično aktivacijom sustava drugih glasnika
2. direktnim djelovanjem na neki ionski kanal

Promjenom vodljivosti membrane dolazi do promjene količine naboja koji prolaze kroz membranu. Oni ovise o koncentracijama iona s obije strane stanične membrane (kemijski gradijent) te početnom potencijalu membrane (električni gradijent). Tako bi inhibicija kalijskih kanala mogla dovesti do depolarizacije koja će biti viša ako je početni potencijal bio viši. To je prikazano i za učinak timoglobulina te bi u našim rezultatima upravo inhibicija kalijskih kanala mogla biti odgovorna za depolarizaciju uzrokovanu timoglobulinom (slike 11. do 14.) Da bi se ustvrdio direktan ili indirektan učinak timoglobulina na ionske kanale, potrebno je naknadno istraživanje.

5.3. Učinci timoglobulina na hipoksično-reoksigenacijska oštećenje HEK-293 stanica

Kako smo već pokazali proučavajući učinak na promjenu membranskog potencijala, otapalo je pokazalo učinak i na smrtnost stanica time što se postotak smrtnosti, nastao djelovanjem hipoksijsko-reoksigenacijskih uvjeta, smanjuje s povećanjem koncentracije glicerola u staničnom mediju kontrolnih stanica. Glicerol sam po sebi ima protektivni učinak te je radi toga trebalo voditi posebnu brigu da koncentracija glicerola u kontrolnim i pokusnim skupinama bude ista (slika 19.A).

Prema rezultatima Yokote i sur. poznato je da timoglobulin smanjuje broj T-limfocita ovisno o komplementu (Yokota i sur., 2002.). U svim našim pokusima istražili smo ima li komplement učinak na smrtnost i migraciju HEK-293 stanica u testu grebanja u hipoksijsko-reoksigenacijskim uvjetima. Komplement je jedino pri koncentraciji timoglobulina od 80 μg/mL, u normoksijskim uvjetima, smanjio migraciju stanica dok u istim uvjetima na smrtnost stanica nije imao učinak. Da bismo ustvrdili mehanizam djelovanja komplementa u ovim uvjetima, potrebna su daljnja istraživanja. Iz naših rezultata možemo zaključiti da komplement nije važan u djelovanju timoglobulina u hipoksijsko-reoksigenacijskim uvjetima.

U normoksijskim uvjetima timoglobulin nije doveo do povećanja smrtnosti stanica, ali je smanjio razmak između stanica u testu grebanja što je očigledan učinak na migraciju stanica. Ovaj učinak je nestao u hipoksijsko-reoksigenacijskim uvjetima zbog zaštitnog djelovanja timoglobulina, koji smanjuje smrtnost stanica nastalih zbog nedostatka kisika, te stvaranja kisikovih radikala nakon reoksigenacije. Ovi se učinci timoglobulina smanjuju s

porastom koncentracije te pri 80 μg/mL pokazuje najmanji učinak kad i učinak na timoglobulina na membranski potencijal pada (slike 16. do 23.).

Budući da smo dokazali pozitivan učinak timoglobulina na HEK-293 stanice na temelju ovih rezultata možemo spekulirati da bi timoglobulin mogao imati i pozitivne učinke na tkivo bubrega nakon transplantacije. Posebnu pažnju treba obratiti na primijenjenu dozu, jer smo pokazali da timoglobulin gubi svoja protektivna svojstva pri visokim koncentracijama.

6. ZAKLJUČAK

Zbog spoznaje da se timoglobulin veže na veliki raspon antigena i koristi u pacijenata nakon transplantacije bubrega, postavili smo hipotezu da se timoglobulin može vezati direktno za ljudske embrionalne stanice porijeklom iz bubrega (HEK-293) te smanjiti veličinu oštećenja i smrtnost stanica direktnim djelovanjem tijekom nastanka hipoksijsko-reoksigenacijskog oštećenja.

U ovom radu pokazali smo da timoglobulin, osim što djeluje na imunološki sustav, djeluje direktno i na embrionalne stanice porijeklom iz bubrega. Timoglobulin mijenja membranski potencijal ovisno o početnom potencijalu stanice i o koncentraciji s maksimalnim učinkom pri koncentraciji od 40 μg/mL. Nadalje, timoglobulin smanjuje smrtnost stanica nastalu zbog nedostatka kisika te naknadne reoksigenacije i stvaranja kisikovih radikala. Pri višoj koncentraciji timoglobulina dolazi do smanjenja učinka na membranski potencijal i potpunog nedostatka učinka na smrtnost i migraciju stanica u hipoksično-reoksigenacijskim uvjetima. Da bismo otkrili mogući razlog ovog smanjivanja učinka pri višim koncentracijama potrebna su daljnja istraživanja. Svi su navedeni učinci bili neovisni o komplementu.

Na temelju rezultata prikazanih u ovom radu možemo pretpostaviti da bi timoglobulin mogao imati slične pozitivne učinke na tkivo bubrega nakon transplantacije. Za dokaz ove pretpostavke nužna su daljnja istraživanja. Posebnu pažnju treba obratiti na primijenjenu dozu, jer timoglobulin gubi svoja protektivna svojstva pri visokim koncentracijama.

7. POPIS LITERATURE

1. Abraham E, Wunderink R, Silverman H, Perl TM, Nasraway S, Levy H, Bone R, Wenzel RP, Balk R, Allred R, et al. Efficacy and safety of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor alpha in patients with sepsis syndrome. A randomized, controlled, double-blind, multicenter clinical trial. TNF-alpha MAb Sepsis Study Group. JAMA 1995;273:934-941.

2. Abramowicz D, Wissing KM, Broeders N. Immunosuppression for renal transplantation. In: Davison AM, Cameron JS, Grünfeld JP, Ponticelli C, Ritz E, Winearls CG (eds). Oxford textbook of clinical nephrology. Oxford: Oxford University Press, 2005; 2060-2072.

3. Acosta J, Qin X, Halperin J. Complement and complement regulatory proteins as potential molecular targets for vascular diseases. Curr Pharm Des 2004;10:203–211.

4. Alberts B. Molecular biology of the cell. Garland publishing inc., New York & London, 1983.

5. Al-Mehdi AB, Fisher AB. Invited editorial on »tumor necrosis factor-alpha in ischemia and reperfusion injury in rat lungs. J Appl Physiol 1998;85:2003–2004.

6. Andreis I. Imunologija, Medicinska naklada Zagreb, 2004.

7. Arumugam TV, Shiels IA, Woodruff TM, Granger DN, Taylor SM. The role of the complement system in ischemia-reperfusion injury. Shock 2004;21:401–409.

8. Beiras-Fernandez A, Chappell D, Hammer C, Beiras A, Reichart B, Thein E. Impact of polyclonal anti-thymocyte globulins on the expression of adhesion and inflammation molecules after ischemia-reperfusion injury. Transpl Immunol 2009;20:224-228.

9. Beiras-Fernandez A, Thein E, Chappel D, Gallego R, Fernandey-Roel D, Kemming G, Hammer C. Polyclonal antithymocyte globulins influence apoptosis in reperfused tissues after ischaemia in a non-human primate model. Transpl Int 2004;17:453–457.

10. Berns MW. Stanice; Školska knjiga, Zagreb, 1997.

11. Berthoux F, Abramowicz D, Bradley B. European Best Practice Guidelines for Renal Transplantation (Part 2). Section IV: Long–term management of the transplant recipient. Nephrol Dial Transplant 2002;17(Suppl 4):3-67.

12. Bhatia M, Moochhala S. Role of inflammatorymediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. J Pathol 2004;202:145–156.

13. Book WM. Carvedilol: a nonselective beta blocking agent with antioxidant properties. Congest Heart Fail 2002;8:173–177.

14. Bourdage JS, Hamlin MD. Comparative polyclonal antithymocyte globulin and antilymphocyte/antilymphoblast globulin anti-CD antigen analysis by flow cytometry. Transplantation 1995;59:1194–1200.

15. Bown MJ, Nicholson ML, Bell PR, Sayers RD. Cytokines and inflammatory pathways in the pathogenesis of multiple organ failure following abdominal aortic aneurysm repair. Eur J Vasc Endovasc Surg 2001;22:485–495.

16. Brennan DC, Flavin K, Lowell JA, Howard TK, Shenoy S, Burgess S, Dolan S, Kano JM, Mahon M, Schnitzler MA, Woodward R, Irish W, Singer GG. A randomized, double-blinded comparison of Thymoglobulin versus Atgam for induction immunosuppressive therapy in adult renal transplant recipients. Transplantation 1999;67:1011–1018.

17. Brown M, McGuinness M, Wright T, Ren X, Wang Y, Boivin GP, Hahn H, Feldman AM, Jones WK. Cardiac-specific blockade of NF-{kappa}B in cardiac pathophysiology: differences between acute and chronic stimuli in vivo. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2005;289:H466–476.

18. Brudnjak Z. Biološki etiološki čimbenici. U:Gamulin S, Marušić M, Krvavica S. Patofizilogija, JUMENA Zagreb 1990 707-709.

19. Chang MS, McNinch J, Basu R, Simonet S. Cloning and characterization of the human neutrophil-activating peptide (ENA-78) gene. J Biol Chem 1994;269:25277–25282.

20. Charpentier B. A three arm study comparing immediate tacrolimus therapy with ATG induction therapy followed by either tacrolimus or cyclosporine in adult renal transplant recipients. Transplant Proc 2002;34:1625–1626.

21. Chappell D, Beiras-Fernandez A, Hammer C, Thein E. In vivo visualisation of the effect of polyclonal antithymocyte globulins on the microcirculation after ischaemia/ reperfusion in a primate model. Transplantation 2006;81:552–558.

22. Chow CW, Herrera Abreu MT, Suzuki T, Downey GP. Oxidative stress and acute lung injury. Am J Respir Cell Mol Biol 2003;29:427–431.

23. Cooper GM. Bioenergetics and Metabolism Mitochondria, Chloroplasts, and Peroxisomes . U: Cooper GM (ed.) The Cell: A Molecular Approach, 2nd Edition. ASM Press, Washington,D.C. 2000

24. Collard CD, Montalto MC, Reenstra WR, Buras JA, Stahl GL. Endothelial oxidative stress activates the lectin complement pathway: role of cytokeratin 1. Am J Pathol 2001;159:1045–1054.

25. Cotelle N. Role of flavonoids in oxidative stress. Curr Top Med Chem 2001;1:569–590.

26. Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. Pharmacol Rev 2001;53:135–159.

27. Deanović Ž. Učinci ionizacijskog zračenja. U: Gamulin S, Marušić M, Krvavica S. Patofizilogija, JUMENA Zagreb 1990;675-681.

28. Ding WX, Yin XM. Dissection of the multiple mechanisms of TNFalpha- induced apoptosis in liver injury. J Cell Mol Med 2004;8:445–454.

29. Donnahoo KK, Shames BD, Harken AH, Meldrum DR. Reviewarticle: the role of tumor necrosis factor in renal ischemia-reperfusion injury. J Urol 1999;162:196–203.

30. EBPG Expert Group on Renal Transplantation. European Best Practice Guidelines for Renal Transplantation (Part 1). Section III: The transplant recipient from initial

transplant hospitalization to 1 year post-transplant. III.9 Rejection: diagnosis and treatment. Nephrol Dial Transplant 2000;15:77-83.

31. Ferrari R. The role of TNF in cardiovascular disease. Pharmacol Res 1999;40:97–105.

32. Furuichi K, Wada T, Yokoyama H, Kobayashi KI. Role of cytokines and chemokines in renal ischemia-reperfusion injury. Drug News Perspect 2002;15:477–482.

33. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. N Engl J Med 1999;340:448–454.

34. Gamulin S. Stanični energijski naboj i funkcija mitohondrija. U: Gamulin S, Marušić M, Kovač Z. Patofiziologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2002a, 108–109.

35. Gamulin S. Poremećaji vjesničkih molekula i putova. U: Gamulin S, Marušić M, Kovač Z. Patofiziologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2002b;69–73.

36. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappaB and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. Annu Rev Immunol 1998;16:225–260.

37. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. Br J Surg 1994;81:637–647.

38. Greger R, Kunzelmann K. Simultaneous recording of the cell membrane potential and properties of the cell attached membrane of HT29 colon carcinoma and CF-PAC cells. Pflügers Arch. 1991;419:209–211.

39. Guyton AC, Hall JE . Insuficijencija disanja – patofiziologija, dijagnoza, liječenje kisikom. U: Guyton&Hall. Medicinska fiziologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2012; 484 - 492.

40. Halliwell B. The biological significance of oxygen-derived species. U: Valentine JS, Foote CS, Greenberg A, Liebman JF, ur. Active oxygen in biochemistry. New York: Blackie Academic & Professional; 1995; 313–335.

41. Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. N Engl J Med 2004;351:2715-2729.

42. Hobbs JB, Chusilp S, Kincaid-Smith P, McIver MA. The mechanism of glycerol-induced acute renal failure. J Lab Clin Med. 1976;88:44-53.

43. Hoffman JW Jr, Gilbert TB, Poston RS, Silldorff EP. Myocardial reperfusion injury: etiology, mechanisms, and therapies. J Extra Corpor Technol 2004;36:391–411.

44. Hur GM, Ryu YS, Yun HY, Jeon BH, Kim ZM, Seok JH, Lee JH. Hepatic ischemia/reperfusion in rats induces iNOS gene transcription by activation of NF-kappaB. Biochem Biophys Res Commun 1999;261:917–922.

45. Ivančević Ž, MSD priručnik dijagnostike i terapije, The Merck manual, Placebo d.o.o. Split, 2010.

46. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. Extrinsic regulation of unwanted immune responses. In: Immunobiology. New York: Garland Science Publishing, 2005;613-630.

47. Kawamura E, Yamanaka N, Okamoto E, Tomoda F, Furukawa K. Response of plasma and tissue endothelin-1 to liver ischemia and its implication in ischemia-reperfusion injury. Hepatology 1995;21:1138–1143.

48. Kelava T, Cavar I, Culo F. Influence of small doses of various drug vehicles on acetaminophen-induced liver injury. Can J Physiol Pharmacol 2010;88:960-967.

49. Kilgore KS, Friedrichs GS, Homeister JW, Lucchesi BR. The complement system in myocardial ischaemia/reperfusion injury. Cardiovasc Res 1994;28:437–444.

50. Koeppel TA, Thies JC, Schemmer P, Trauner M, Gebhard MM, Otto G, Post S. Inhibition of nitric oxide synthesis in ischemia/reperfusion of the rat liver is followed by impairment of hepatic microvascular blood flow. J Hepatol 1997;27:163–169.

51. Kovač Z. Patogenetske vrste smrti stanice. U: Gamulin S, Marušić M, Krvavica S. ur. Patofizilogija, Zagreb: JUMENA; 1990, 105.

52. Kovač Z, Gamulin S. Upala – odgovor akutne faze. U: Gamulin S,Marušić M, Kovač Z. Patofiziologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2002a; 507–514.

53. Kovač Z, Gamulin S. Sustavni upalni odgovor i višesustavno zatajenje organizma. U: Gamulin S, Marušić M, Kovač Z. Patofiziologija.Zagreb: Medicinska naklada; 2002b, 514–516.

54. Krvavica S, Gamulin S. Integralna reakcija stanice na ozljedu. U: Gamulin S, Marušić M, Kovač Z. Patofiziologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2002, 115–123.

55. Kumar V, Cortan RS, Robbins SL. Osnove patologije, Školska knjiga, Zagreb 2000.

56. Levinson W. Pathogenesis. U: Levinson W. Review of medical microbiology and immunology. 12 izd. New York: McGraw-Hill Companies-Lange, 2012; 31-51.

57. Lewis RM. Induction and maintenance immunosuppressive therapy in renal transplant recipients. In: Malluche HH, Sawaya BP, Hakim RM, Sayegh MH (eds). Clinical nephrology, dialysis and transplantation. Deisenhofen: Dustri Verlag Dr. Karl Feistle, 2004;1-49.

58. Luedde T, Assmus U, Wustefeld T, Meyer zu Vilsendorf A, Roskams T, Schmidt-Supprian M, Rajewsky K, Brenner DA, Manns MP, Pasparakis M, Trautwein C. Deletion of IKK2 in hepatocytes does not sensitize these cells to TNF-induced apoptosis but protects from ischemia/reperfusion injury. J Clin Invest 2005;115:849–859.

59. Luscinskas FW, Ma S, Nusrat A, Parkos CA, Shaw SK. Leukocyte transendothelial migration: a junctional affaire. Semin Immunol 2002;14:105–113.

60. Magee CC, Sayegh MM. Allograft dysfunction: differential diagnosis and management. In: Malluche HH, Sawaya BP, Hakim RM, Sayegh MH (eds). Clinical nephrology, dialysis and transplantation. Deisenhofen: Dustri Verlag Dr. Karl Feistle, 2004;1-36.

61. Marczin N, El-Habashi N, Hoare GS, Bundy RE, Yacoub M. Antioxidants in myocardial ischemia-reperfusion injury: therapeutic potential and basic mechanisms. Arch Biochem Biophys 2003;420:222–236.

62. McCord JM, Roy RS, Schaffer SW. Free radicals and myocardial ischemia. The role of xanthine oxidase. Adv Myocardiol 1985;5:183–189.

63. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. N Engl J Med 1985;312:159–163.

64. Meier-Kriesche HU, Schold JD, Srinivas TR, Kaplan B. Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era. Am J Transplant 2004;4:378-383.

65. Meldrum DR. Tumor necrosis factor in the heart. Am J Physiol 1998;274:R577–595.

66. Murohara T, Guo JP, Delyani JA, LeferAM. Cardioprotective effects of selective inhibition of the two complement activation pathways in myocardial ischemia and reperfusion injury. Methods Find Exp Clin Pharmacol 1995;17:499–507.

67. Naranscik P. Poremećaji termoregulacije. U: Gamulin S, Marušić M, Krvavica S. Patofizilogija, Zagreb: JUMENA 1990; 467-475.

68. Paller MS. Free radical-mediated postischemic injury in renal transplantation. Ren Fail 1992;14:257–260.

69. Pemberton M, Anderson G, Vetvicka V, Justus DE, Ross GD. Microvascular effects of complement blockade with soluble recombinant CR1 on ischemia/reperfusion injury of skeletal muscle. J Immunol 1993;150:5104–5113.

70. Pham PTT, Pham PCT, Wilkinson AH. Management of the renal transplant recipient. The early management of the recipient. In: Davison AM, Cameron JS, Grünfeld JP, Ponticelli C, Ritz E, Winearls CG (eds). Oxford textbook of clinical nephrology. Oxford: Oxford University Press, 2005;2087-2101.

71. Phan TG, Wright PM, Markus R, Howells DW, Davis SM, Donnan GA. Salvaging the ischaemic penumbra: more than just reperfusion? Clin Exp Pharmacol Physiol 2002;29:1-10.

72. Pincemail J. Free radicals and antioxidants in human diseases U: Favier A, Cadet J, Kalyanaraman B, Fontecave M, Pierre JL. Analysis of free radicals in biological systems. Basel: Birkhauser Verlag; 1995, 83–98.

73. Plestina S, Gamulin S. Kidney ischaemia-reperfusion injury and polyribosome structure. Nephron 2001;89:201–207.

74. Pober JS. Warner-Lambert/Parke-Davis award lecture. Cytokine-mediated activation of vascular endothelium. Physiology and pathology. Am J Pathol 1988;133:426–433.

75. Ratych RE, Bulkley GB. Free-radical-mediated postischemic reperfusion injury in the kidney. J Free Radic Biol Med 1986;2:311–319.

76. Ryles MT, Pilmanis AA. The initial signs and symptoms of altitude decompression sickness. Aviat Space Environ Med 1996; 67:983.

77. Schlatter E, Schafer JA. Electrophysiological studies in principal cells of rat cortical collecting tubules. ADH increases the apical membrane Na - conductance. Pflügers Arch. 1987;409:81–92.

78. Schneeberger H, Aydemir S, Illner WD, Land W. Non-specific primary ischemia/ reperfusion injury in combination with secondary specific acute rejection-mediated injury of human kidney allografts contributes mainly to development of chronic transplant failure. Transplant Proc. 1997;29:948–949.

79. Schweizer RT, Rovelli M, Palmeri D, Vossler E, Hull D, Bartus S. Non-compliance in organ transplant recipients. Transplantation 1991;49:374-377.

80. Scommotau S, Uhlmann D, Loffler BM, Breu V, Spiegel HU. Involvement of endothelin/nitric oxide balance in hepatic ischemia/reperfusion injury. Langenbecks Arch Surg 1999;384:65–70.

81. Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury. Am J Surg 2001;181:160–166.

82. Souza DG, Vieira AT, Pinho V, Sousa LP, Andrade AA, Bonjardim CA, McMillan M, Kahn M, Teixeira MM. NF-kappaB plays a major role during the systemic and local

acute inflammatory response following intestinal reperfusion injury. Br J Pharmacol 2005;145:246–254.

83. Stewart DJ, Kubac G, Costello KB, Cernacek P. Increased plasma endothelin-1 in the early hours of acute myocardial infarction. J Am Coll Cardiol 1991;18:38–43.

84. Strieter RM, Kunkel SL, Bone RC. Role of tumor necrosis factor-alpha in disease states and inflammation. Crit Care Med 1993;21:S447–S463.

85. Šprung J, Marušić M. Patofiziologija starenja. U: Gamulin S, Marušić M, Krvavica S. Patofizilogija, JUMENA Zagreb, 1990; 604-611.

86. Taradi M. Ozljede električnom strujom. U: Gamulin S, Marušić M, Krvavica S. Patofizilogija, JUMENA Zagreb, 1990; 665-669.

87. Thornton AJ, Strieter RM, Lindley I, Baggiolini M, Kunkel SL. Cytokine-induced gene expression of a neutrophil chemotactic factor/IL-8 in human hepatocytes. J Immunol 1990;144:2609–2613

88. Tomei LD, Cope FO. Apoptosis: The molecular basis of cell death, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1991.

89. Warner DS, Sheng H, Batinić-Haberle I. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. J Exp Biol 2004;207:3221–3231.

90. Watanabe T, Suzuki N, Shimamoto N, Fujino M, Imada A. Contribution of endogenous endothelin to the extension of myocardial infarct size in rats. Circ Res 1991;69:370–377.

91. Westenfelder C, Arevalo GJ, Crawford PW, Zerwer P, Baranowski RL, Birch FM, Earnest WR, Hamburger RK, Coleman RD, Kurtzman NA. Renal tubular function in glycerol-induced acute renal failure. Kidney Int 1980;18:432-444.

92. Ye JH, Zhang J, Xiao C, Kong JQ. Patch-clamp studies in the CNS illustrate a simple new method for obtaining viable neurons in rat brain slices: glycerol replacement of NaCl protects CNS neurons. J Neurosci Methods 2006;158:251-259.

93. Yeh CH, Lin YM, Wu YC, Lin PJ. Inhibition of NF-kappaB activation can attenuate ischemia/reperfusion-induced contractility impairment via decreasing cardiomyocytic proinflammatory gene up-regulation and matrix metalloproteinase expression. J Cardiovasc Pharmacol 2005;45:301–309.

94. Yokota N, Daniels F, Crosson J, Rabb H. Protective effect of T cell depletion in murine renal ischemia–reperfusion injury. Transplantation 2002;74:638–759.

95. Yoshidome H, Kato A, Edwards MJ, Lentsch AB. Interleukin-10 suppresses hepatic ischemia/reperfusion injury in mice: implications of a central role for nuclear factor kappaB. Hepatology 1999;30:203–208.

96. Zhou W, Farrar CA, Abe K, Pratt JR, Marsh JE, Wang Y, Stahl GL, Sacks SH. Predominant role for C5b-9 in renal ischemia/reperfusion injury. J Clin Invest. 2000;105:1363–1371.

97. Živčić-Ćosić S, Trobonjača Z, Rački S. Imunosupresivno liječenje kod presađivanja bubrega. Medicina fluminensis 2010;46:413-423.

8. POPIS SLIKA

Slika 1. Životinjska stanica 6

Slika 2. Građa mitohondrija 7

Slika 3. Stvaranje slobodnih radikala kisika tijekom reperfuzije i reoksigenacije 24

Slika 4. Uloga NFκB u posredovanju upalne reakcije tijekom hipoksično-reoksigenacijskog oštećenja 26

Slika 5. Mjesta djelovanja imunosupresivnih lijekova 35

Slika 6. Stanice HEK-293 40

Slika 7. Metoda prikovanih potencijala 45

Slika 8. Stanična kultura HEK-293 stanica prikazane u pokusu mjerenja membranskih potencijala 46

Slika 9. Originalni zapis promjene membranskog potencijala V_m 47

Slika 10. Test grebanja 49

Slika 11. Odnos početnog membranskog potencijala (V_m) i promjene membranskog potencijala (ΔV_m) uzrokovanog porastom izvanstanične koncentracije K^+ 52

Slika 12. Depolarizacijski učinak timoglobulina, ATG-F-a te zečjeg IgG na membranski potencijal HEK-293 stanica 53

Slika 13. Odnos početnog membranskog potencijala (V_m) i promjene membranskog potencijala (ΔV_m) uzrokovanog timoglobulinom 54

Slika 14. Depolarizacijski učinak timoglobulina ovisan o koncentraciji 55

Slika 15. Vezivanje timoglobulina na površinu HEK-293 stanica 56

Slika 16. Timoglobulin 20 μg/mL smanjuje smrtnost HEK-293 stanica u hipoksijskim uvjetima 57

Slika 17. Timoglobulin 40 μg/mL smanjuje smrtnost HEK-293 stanica u hipoksijskim uvjetima 58

Slika 18. Timoglobulin 80 μg/mL ne smanjuje smrtnost HEK-293 stanica u hipoksijskim uvjetima 59

Slika 19. Učinak timoglobulina na smrtnost HEK-293 stanica u hipoksijsko-reoksigenacijskim uvjetima 61

Slika 20. Timoglobulin 20 μg/mL smanjuje udaljenost između HEK-293 stanica u hipoksijsko-reoksigenacijskim uvjetima u odnosu na normoksijske uvjete 62

Slika 21. Timoglobulin 40 μg/mL smanjuje udaljenost između HEK-293 stanica u hipoksijsko-reoksigenacijskim uvjetima u odnosu na normoksijske uvjete 63

Slika 22. Timoglobulin pri koncentraciji od 80 μg/mL nema učinak na udaljenost između HEK-293 stanica u hipoksijsko-reoksigenacijskim uvjetima u odnosu na normoksijske uvjete 64

Slika 23. Učinak timoglobulina u testu grebanja u hipoksijsko-reoskigenacijskim uvjetima 65

9. ŽIVOTOPIS

Franjo Jurenec je rođen 09. travnja 1967. godine u Varaždinu. Osnovnu školu je završio u Bednji u Hrvatskom zagorju. Srednju medicinsku školu za zanimanje zdravstveni stručni radnik fizioterapeutskog smjera završio je također u Varaždinu. Medicinski fakultet u Zagrebu upisao je 1986. godine, nakon čega odlazi na odsluženje vojnog roka. Studij medicine započeo je 1987. godine i završio ga u roku. Diplomirao je u siječnju 1993. godine, s prosjekom ocjena 4,20. Pripravnički staž je odradio u OB Dubrava u razdoblju od svibnja 1994. godine do svibnja 1995. godine, a nakon toga je radio u DZ Maksimir u Zagrebu. U veljači 1996. godine zaposlio se u Ministarstvu obrane RH gdje je radio do studenog 2001. godine. Od prosinca 2001. godine do ožujka 2007. godine bio je na specijalizaciji iz urologije. Specijalistički ispit je položio 02. ožujka 2007. godine. Od 2006. godine radi u KB Merkur, a od ožujka 2007. godine na poslovima specijalista urologa. Poseban interes ima za transplantacijsku medicinu i urološku onkologiju.

Za vrijeme Domovinskog rata je tijekom 1991.-1992. godine radio u Glavnom sanitetskom Stožeru RH gdje se bavio zdravstvenom zaštitom prikadnika Oružanih snaga RH. Za vrijeme oslobodilačke operacije „Oluja“ bio je pripadnik 14. domobranske pukovnije Slunj (kolovoz 1995. god.), a nakon toga Načelnik saniteta 109. domobranske pukovnije Vinkovci (studeni 1995. – veljača 1996. godine). U veljači 1996. prelazi u djelatni sastav Hrvatske vojske u Hrvatsko ratno zrakoplovstvo i PZO. Radio je u Zrakoplovnim bazama Lučko i Pleso gdje je radio do početka specijalizacije iz urologije (studeni 2001.) Demobiliziran je s činom satnika HV i nositelj je medalje „Oluja“. Sa suprugom Silvanom je u braku od 1997. godine i imaju dva sina, Domagoja (rođ. 1998.) i Tomislava (rođ. 2003.).

Tijekom profesionalnog rada sudjelovao je na brojnim stranim i domaćim stručnim skupovima.

- 7. sastanak Urologa Središnje Europe u Zagrebu (listopad 2007)
- 23. godišnji kongres Europskog urološkog društva u Milanu (ožujak 2008);
- Europski transplantacijski kongres u Parizu (rujan 2009.);
- Kongres kliničke citologije u Splitu u u rujnu 2009.;
- 25. godišnji kongres Europskog urološkog društva u Barceloni (2010);
- 26. godišnji kongres Europskog urološkog društva u Beču (2011.);
- Europski transplantacijski kongres u Glasgowu (rujan. 2011.);
- Transplantacijski kongres u Beču,
- Intenzivan tečaj laparoskopske urološke kirurgije u Strassbourgu (06.06.2011.-10.06.2011.),
- Međunarodni kongres „Endourologija danas“ u Vidicama-Šibenik (travanj 2012.)
- 5. Kongres hrvatskog urološkog društva sa međunarodnim sudjelovanjem (listopad 2013.);
- Urološki simpozij u Splitu (listopad 2015.).

Izvorni znanstveni i pregledni radovi u CC časopisima:

1. Vidas, Željko; Mišić, Maja; Pačić, Arijana; Jurenec, Franjo; Knotek, Mladen; Kardum-Skelin, Ika. The Value of Urinary Decoy Cell Finding in Patients with Kidney Transplantation. Collegium antropologicum. 34 (2010) , 1; 153-157.

Ostali radovi u drugim časopisima:

1. Knotek, Mladen; Sabljar Matovinović, Mirjana; Škegro, Dinko; Mihovilović, Karlo; Kovačević Vojtušek, Ivana; Gracin, Sonja; Jadrijević, Stipislav; Kocman, Branislav; Vidas, Željko; Jurenec, Franjo; Guštin, Denis; Čakalo, Dubravka; Žmire, Milica; Buhin, Majda. Simultano presađivanje bubrega i gušterače. Medix : specijalizirani medicinski dvomjesečnik. 17 (2011) , 92/93; 204-206 (članak, stručni).

Kongresno priopćenje (sažeci) u CC časopisu:

1. Jurekovic, Zeljka; Ljubanović, Danica; Gracin, Sonja; Kovacevic-Vojtusek, Ivana; Vidas, Zeljko; Jurenec, Franjo; Jadrijevic, Stipislav; Kocman, Branislav; Skopljanac, Andrija; Zmire, Milica; Cakalo, Dubravka; Gustin, Denis; Sabljar-Matovinovic, Mirjana; Knotek, Mladen. Living donor and recipient variables associated with renal graft function. J Am Soc Nephrol. 2008 ; 19: 882A.

Kongresno priopćenje (sažeci) u ostalim časopisima:

1. Knotek, Mladen; Sabljar-Matovinović, Mirjana; Ljubanović, Danica; Škegro, Dinko; Kovačević-Vojtušek, Ivana; Gracin, Sonja; Prkačin, Inga; Vidas, Željko; Jadrijević, Stipislav; Kocman, Branislav; Škopljanac, Andrija; Jurenec, Franjo; Guštin, Denis; Žmire, Milica; Čakalo, Dubravka. Rano ukidanje steroida u pacijenata s presađenim bubregom sa živog darivatelja Sažetci 5. Hrvatskog kongresa nefrologije, dijalize i transplantacije. 2008. 151-151

2. Puškar, Damir; Bartolin, Željko; Bedalov, Goran; Savić, Ivan; Peršec, Zoran; Jurenec, Franjo. Rezultati liječenja bolesnika s karcinomom "in situ" gornjeg dijela urinarnog sustava, Med Vjesn 37; 2005: 59-61.

3. Bedalov, Goran; Bartolin, Željko; Puškar, Damir; Savić, Ivan; Peršec, Zoran; Jurenec, Franjo. Endoskopska laserska ablacija prostate (ELAP) - rezultati nakon devet godina, Med Vjesn 37; 2005:105-08.

4. Bedalov, Goran; Bartolin, Željko; Zeljko, Žarko; Puškar, Damir; Savić, Ivan; Radović, Nikola; Peršec, Zoran; Jurenec, Franjo. Radikalna prostatektomija-pozitivni kirurški rubovi. Med Vjesn 37; 2005: 95-97.

Sažeci u zbornicima skupova:

1. Vidas, Željko; Mišić, Maja; Pačić, Arijana; Jurenec, Franjo; Knotek, Mladen; Kardum-Skelin, Ika.The Value of Urinary Decoy Cell Finding in Patients with Kidney Transplantation: A Single Center Experience, Knjiga sažetaka 4. Hrvatski kongres kliničke citologije, 1. Hrvatski simpozij analitičke citologije i 2. Hrvatski simpozij citotehnologije s međunarodnim sudjelovanjem / Kardum-Skelin, Ika ; Batinić, Drago ; Anić, Veronika (ur.).

2. Butorac, Dražan; Jurenec, Franjo; Herman Mahečić, Davorka; Vrkljan, Milan; Kruljac, Ivan; Radulović, Petra; Kuna, Krunoslav; Kraljević, Zdenko; Filipović Djaković, Ivka; Tučkar, Neven. Granuloza tumor jajnika i rak endometrija-Prikaz slučaja. 10. Hrvatski kongres o ginekološkoj endokrinologiji, i humanoj reprodukciji i menopauzi. Brijuni, 10-13. 09. 2015.